

新規ヘリコバクター・ピロリ除菌薬
(4-Methylbenzyl 4'-[*trans*-4-(guanidinomethyl)
cyclohexylcarbonyloxy] biphenyl-4-carboxylate monohydrochloride
(TG44)) / β -シクロデキストリンの固体複合体形成と
そのプレフォーミュレーション

2006

安西 欣清

Solid-state Inclusion Complexation of A New *Helicobacter Pylori*
Eradication Agent, 4-Methylbenzyl 4'-[*trans*-4-(guanidinomethyl)
cyclohexylcarbonyloxy] biphenyl-4-carboxylate monohydrochloride
(TG44), with β -Cyclodextrin and Its Preformulation

Kinsei Anzai

Solid-state Inclusion Complexation of A New *Helicobacter Pylori* Eradication Agent, 4-Methylbenzyl 4'-[*trans*-4-(guanidinomethyl)cyclohexylcarbonyloxy] biphenyl-4-carboxylate monohydrochloride (TG44), with β -Cyclodextrin and Its Preformulation

Kinsei Anzai

4-Methylbenzyl 4'-[*trans*-4-(guanidinomethyl)cyclohexylcarbonyloxy] biphenyl-4-carboxylate monohydrochloride (TG44) is a promising *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) eradicating agent, because of its high selective antibacterial activity to *H. pylori*. However, pharmaceutical applications of TG44 are limited due to its very low solubility in water (0.036 mM at 25 °C). In this study, we attempted to improve the low solubility and the antibacterial activity of TG44 by means of cyclodextrin (CyD) complexation. The inclusion complexation of TG44 with β -CyD in aqueous solution was investigated by the solubility method and ultraviolet (UV), circular dichroism (CD), fluorescence and ^1H -nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopic methods. The interaction of TG44 with β -CyD in solid state was studied by powder X-ray diffractometry, thermal analysis and solid-state NMR spectroscopy. In particular, solid-state two-dimensional ^{13}C - ^1H -heteronuclear correlation (2D HETCOR) NMR studies and measurements of the spin-lattice relaxation time in the rotating frame ($T_{1\rho}^{\text{H}}$) were carried out to gain insight into the inclusion mode of TG44/ β -CyD complex in amorphous state. Further, the *in-vitro* antibacterial activity of TG44 was tested against 14 clinical isolates of *H. pylori*, and the *in-vivo* antibacterial activity of TG44/ β -CyD complex was tested against *H. pylori* infected gerbils. The results are summarized as follows:

- 1) TG44 gave a Bs-type phase solubility diagram with β -CyD in water, showing a linear increase in solubility of the drug up to 8 mM β -CyD concentration. The solubility of TG44 (0.036 mM in water at 25 °C) increased about 70-folds in the presence of 8 mM β -CyD. UV, CD, fluorescence and ^1H -NMR spectroscopic results indicated that TG44 forms the inclusion complex with β -CyD in a 1:1 stoichiometry and the biphenyl moiety of TG44 is preferably included in the β -CyD cavity in water.
- 2) The Giordano plot made by monitoring changes in the fusion enthalpy of TG44 (about 184 °C) suggested that TG44 forms the 1:1 complex with β -CyD in the solid state. TG44/ β -CyD solid complex in a 1:1 stoichiometry was prepared by the grinding and spray-drying methods, confirming by powder X-ray diffractometry and differential scanning calorimetry (DSC) that the complex is in an amorphous state.
- 3) The solid-state ^{13}C signals of TG44 and β -CyD were significantly broadened by the complexation. As temperature increased, the ^{13}C signals of the aromatic moieties of TG44 were insignificantly influenced, whereas those of the cyclohexyl moiety became sharper. The $T_{1\rho}^{\text{H}}$ values of the aromatic carbons of TG44 were almost identical with those of β -CyD, indicating

sufficient spin diffusion between the aromatic moiety and β -CyD. The ^{13}C - ^1H HETCOR spectra gave the intermolecular correlation peaks between the aromatic carbons of TG44 and the β -CyD protons or between the biphenyl protons of TG44 and the β -CyD carbons, when measured using longer contact times (500 and 1500 μs). These solid NMR spectroscopic data together with aqueous NMR data indicated that β -CyD includes predominantly the biphenyl moiety of TG44 in the solid state.

- 4) TG44/ β -CyD solid complex in a 1:1 stoichiometry was prepared by the grinding and spray-drying methods. DSC measurements indicated that the amount of free TG44 in the complex is below 2%. Various pharmaceutical properties of the complex, such as appearances, particle size, dissolution and hygroscopicity etc., were determined.
- 5) The dissolution rate of TG44/ β -CyD complex was much faster than the simple physical mixture of the drug and β -CyD. It was of interest to note that the complex maintained the high supersaturated concentration (about 5 times the solubility of the corresponding physical mixture) of the drug at least for about 30 min even under the high rotation speed of 900 rpm. These dissolution properties of the complex clearly reflected in the *in-vivo* antibacterial activity.
- 6) The antibacterial activity of TG44 was tested against clinical isolates of *H. pylori* and was compared with those of amoxicillin (AMX), clarithromycin (CAM), and metronidazole (MNZ). TG44 inhibited the growth of *H. pylori* with an MIC range of 0.1 to 1 $\mu\text{g/mL}$. The antibacterial activity of TG44 against CAM- or MNZ-resistant strains was nearly comparable to that against the antibiotic sensitive (non-resistant) strains. TG44 had no antibacterial activity against 14 strains of aerobic bacteria at 25 $\mu\text{g/mL}$, suggesting the highly specific antibacterial activity of TG44 against *H. pylori*. When the 1:1 complex (938 mg/kg) was orally administered to *H. pylori* infected gerbils three times a day, *H. pylori* in all of 5 animals were completely eradicated, whereas the administrations of TG44 alone (300 mg/kg) and β -CyD alone (638 mg/kg) failed to eradicate *H. pylori*.

In conclusion, the present results indicated that TG44 forms the inclusion complex with β -CyD in a molar ratio of 1:1 in aqueous solution and in the solid state. ^{13}C - ^1H HETCOR spectroscopic studies and measurements of $T_{1\rho}^{\text{H}}$ values are demonstrated to be very useful for determination of inclusion modes of the complexes occurred in amorphous form. TG44/ β -CyD solid complex had the fast-dissolving property and maintained the supersaturated concentration of the drug in water. The high *in-vivo* antimicrobial activity of TG44/ β -CyD complex to *H. pylori*, compared with that of TG44 alone, can be attributed to its fast-dissolving property and its ability to maintain the supersaturated state in the gastric fluid, i.e., the prolonged exposure afforded by the higher supersaturated state of TG44 could result in an increased antimicrobial activity against *H. pylori*. The present results will provide useful information for development of new *H. pylori* eradicating agents and their formulation designs.

目 次

緒 言	1
第 1 章 水溶液中における TG44 と β -シクロデキストリンとの相互作用 ..	7
第 1 節 序	7
第 2 節 水溶液中における相互作用	7
2-1 溶解度法	7
2-2 UV 法及び CD スペクトル法	8
2-3 蛍光スペクトル法	11
2-4 ^1H 核磁気共鳴スペクトル法	13
第 3 節 小 括	16
第 2 章 固体状態における TG44 と β -シクロデキストリンとの相互作用 ...	17
第 1 節 序	17
第 2 節 固体状態における相互作用	17
2-1 赤外吸収スペクトル法	17
2-2 質量スペクトル法	18
2-3 粉末 X 線回折法	19
2-4 熱分析法	20
2-5 ^{13}C 固体 NMR スペクトル法	22
第 3 節 小 括	30
第 3 章 TG44/ β -シクロデキストリン複合体の調製	32
第 1 節 序	32
第 2 節 TG44/ β -CyD 複合体の調製	32
2-1 ボールミル法による複合体の調製	32
2-2 噴霧乾燥法による複合体の調製	35
2-3 非包接量の算出	37
第 4 節 小 括	38

第4章 TG44/ β -シクロデキストリン複合体の物理化学的性質	39
第1節 序	39
第2節 TG44/ β -CyD 複合体の物理化学的性質	39
2-1 性状	39
2-2 溶解性	41
2-3 吸湿性	43
2-4 溶出性	44
第3節 小 括	46
第5章 TG44/ β -シクロデキストリン複合体の薬理活性	47
第1節 序	47
第2節 TG44 の <i>in vitro</i> 抗菌活性	47
第3節 TG44 および TG44/ β -CyD 複合体 の <i>in vivo</i> 除菌効果	52
第4節 小 括	55
総 括	56
謝 辞	59
実験の部	60
参考文献	66

本論文で使用した主な略語一覧表

Δ ABS	Absorbance change	吸光度変化
AMPC	Amoxicillin	アモキシシリン
CAM	Clarithromycin	クラリスロマイシン
CD	Circular dichroism	円偏光二色性
CP/MAS	Cross polarization/magic angle spinning	交差分極/マジックアングル スピニング
CyD	Cyclodextrin	シクロデキストリン
DSC	Differential scanning calorimetry	示差捜査熱量測定
FGMF	Free mole fraction of guest	遊離形ゲスト分子のモル分率
HETCOR	Heteronuclear correlation	異種核シフト相関 NMR
<i>H. pylori</i>	Helicobacter pylori	ヘリコバクター・ピロリ
HPLC	High performance liquid chromatography	高速液体クロマトグラフィー
IC ₅₀	50% Inhibitory concentration	50% 発育阻止濃度
K _c	Stability constant	安定度定数
MIC	Minimum inhibitory concentration	最少発育阻止濃度
MNZ	Metronidazole	メトロニダゾール
NMR	Nuclear magnetic resonance	核磁気共鳴
NOE	Nuclear Overhauser effect	核オーバーハウザー効果
PPI	Proton-pump inhibitor	プロトンポンプ阻害剤
ROESY	Rotating frame nuclear Overhauser enhancement spectroscopy	回転座標系 NOE
TG44	4-Methylbenzyl 4'-[trans-4-(guanidino methyl)cyclohexylcarbonyloxy] biphenyl- 4-carboxylate monohydrochloride	4-メチルベンジル 4'-[トラン ス-4-(グアニジノメチル)-シク ロヘキシルカルボニルオキシ] ビフェニル-4-カルボン酸 塩酸 塩

本論文は学術雑誌に投稿中の次の論文を基礎とするものである。

- (1) Two-dimensional ^{13}C - ^1H Heteronuclear Correlation NMR Spectroscopic Studies for Inclusion Complex of Cyclomaltoheptaose (β -Cyclodextrin) with a New *Helicobacter Pylori* Eradicating Agent (TG44) in Amorphous State

K. Anzai, H. Kono, J. Mizoguchi, T. Yanagi, F. Hirayama, H. Arima, K. Uekama:
Carbohydrate Research. In press.

- (2) Improvement of Dissolution Properties of a New *Helicobacter Pylori* Eradicating Agent (TG44) by Inclusion Complexation with β -Cyclodextrin

K. Anzai, J. Mizoguchi, T. Yanagi, F. Hirayama, H. Arima, K. Uekama:
Pharmaceutical Development and Technology. Submitted for publication.

- (3) *In Vitro* Antibacterial Activities of Novel Antimicrobial Agent TG44 for Treatment of *Helicobacter pylori* Infection

O. Kamoda, K. Anzai, J. Mizoguchi, T. Yanagi, M. Shiojiri, T. Nishino, S. Kamiya: Submitted for publication.

緒 言

ヘリコバクターピロリ (*H.ピロリ*、*H. pylori*) は 1983 年オーストラリアの J. R. Warren と B. J. Marshall により報告されたグラム陰性菌である。¹⁾ 細菌類は胃酸分泌により強酸性状態にある胃内では生育できないと考えられていたが、その後の研究から *H.ピロリ* は自らが持つウレアーゼを巧みに利用して胃内で生存する能力を有することが明らかとなった。その後、この耐酸性微生物は酸と関連して潰瘍の原因になること、さらに胃がん発症にも関与することが判明し、世界保健機関 (World Health Organization、WHO) はグループ 1 発癌因子として特定している。²⁾ これまでの疫学調査の結果から、世界の人口の約 50% は *H.ピロリ* に感染し、先進国、発展途上国の感染率はそれぞれ約 25~50% および 80% であると推定され (Table 1)、^{3,5)} その感染は survival form としての球状菌形 (cocoid form) を経由した糞—口経路⁶⁾ や口—口経路⁷⁾ などが考えられて

Table1. Prevalence of *Helicobacter pylori* on different birth cohorts in several countries (%).

	Age	Total	20	40	60	>70
Prevalence Ratio	The United States	50	16	30	60	80
	UK	50	20	30	35	—
	Japan	50	25	40	80	80
	Developing countries	80	75	85	85	—
	Rumania	60	—	—	—	—

いる。したがって、ピロリ除菌療法は、消化性潰瘍の再発防止や胃癌発生の予防に極めて有効であり、さらに胃癌多発国の日本において萎縮性胃炎への応用が期待される。実際、ピロリ除菌療法の成功例では潰瘍の再発が顕著に低下することから、「No *H. Pylori*, No Ulcer」の考えが定着し、「潰瘍症」の概念が将来消える可能性がある。また、ピロリ除菌療法は従来の維持療法が不必要なことから、医療経済効果にも大きな影響を与えるものと考えられる。⁸⁾ Maastricht コンセンサスや Kobe コンセンサスは、ピロリ除菌が必要な疾患として以下のようなものを挙げている (日本ヘリコバクター・ピロリ学会 治

療ガイドライン (1999.11.27、神戸)。

1. 除菌治療が強く勧められる疾患：胃潰瘍・十二指腸潰瘍
2. 専門施設での除菌が進められる疾患：低悪性度胃 MALT リンパ腫
3. 胃がん予防のため除菌が望ましい疾患：胃がんに対する内視鏡的粘膜切除後胃および胃がん術後残胃、慢性萎縮性胃炎、40 歳未満の Hp 陽性者

Table 2 は、ピロリ除菌療法において FDA が認可しているレジメ及びそれらの除菌率を示す。

Table 2. FDA-approved regimens.

Abbreviation	Agent	Dose	Period	Eradication ratio
OC	Omeprazole Clarithromycin	40 mg q a.m. 500 mg t.i.d.	14 days	70・80%
RBC+C	Ranitidine bismuth citrate Clarithromycin	400mg b.i.d. 500 mg t.i.d.	14 days	70・85%
BMT	Bismuth subsalicylate Metronidazole Tetracycline	2 tablets q.i.d. 250 mg q.i.d. 500 mg q.i.d.	14 days	70・90%
LAC	Lansoprazole Amoxicillin Clarithromycin	30 mg b.i.d. 1 g b.i.d. 500 mg b.i.d.	14 days	80・92%
LA	Lansoprazole Amoxicillin	30 mg t.i.d. 1 g t.i.d.	14 days	70%

しかしながら、これら FDA 認可の薬物療法においても除菌率は十分ではなく、除菌失敗の原因^{9, 10)}として服薬コンプライアンスが低い、耐性菌の出現、薬物相互作用、抗生剤の分布と濃度が低いなどが挙げられている。また、最近、耐性菌の出現と除菌率の低下が報告され、^{11, 12)}中でもクラリスロマイシン (CAM) やメトロニダゾール (MNZ) 耐性菌に対する除菌率は有意に低下している。特に CAM、MNZ 両薬物に耐性を持つ場合、Table 3 に示すように、現在のレジメによる除菌は不可能に近いものと考えられる。¹³⁾ MNZ 耐性菌が最近世界的に蔓延しつつあることから、¹⁴⁾ CAM 耐性菌には MNZ を用い、MNZ 耐性菌に対しては用量を上げる除菌方法が実施されているが、十分な効果は得られてないため、耐性菌にも有効な薬剤の開発が望まれている。したがって、今後は既

Table 3. Effect of resistance to an agent on success of antimicrobial therapy.

Resistance to	Success (%)
None	98
MNZ	70
CAM	10
Both	0

存の抗菌剤とは異なる作用機序を有する新規抗菌剤の開発が重要である。^{15, 16)}このような背景のもと、下記のプロファイルを有する新規ピロリ除菌剤の開発を企図した。

1. H.ピロリに対して強い抗菌活性を有する
2. H.ピロリへの選択性が高い
3. 他剤無効例に有効である (耐性菌に対しても有効)

まず、著者らは、最少発育阻止濃度が 100 µg/mL と弱いながらも H.ピロリに対する抗菌活性を有する塩酸ベネキサートベータデクスをリード化合物に選択し、その構造変換を行った。塩酸ベネキサート (Fig. 1 参照) はフェニルエステル及び末端ベンジルエステ

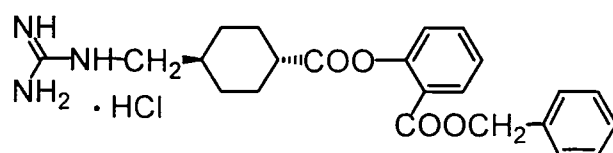


Fig. 1. Chemical structure of benexate hydrochloride.

ルの 2 箇所エステル基を有することに着目して、エステル基の構造変換を行った結果、ビフェニル構造を有する化合物が強い *in vitro* 抗 H.ピロリ活性を示した。次に、末端のベンジルエステル部分の構造変換を行い、H.ピロリのみならず黄色ブドウ球菌、大腸菌に対する抗菌活性を測定し、H.ピロリに対する選択性を検討した。その結果、ビフェニル基を有し、かつベンジルエステル構造を有する化合物は非常に強い抗 H.ピロリ活性を示した。また、H.ピロリ、黄色ブドウ球菌、大腸菌等に対する抗菌活性を検討した結果、末端ベンジル基にメチル基を導入した化合物が H.ピロリに対して最も高い選択性を示した。そこで、下記の構造を有する TG44 を新薬候補化合物として選択した。

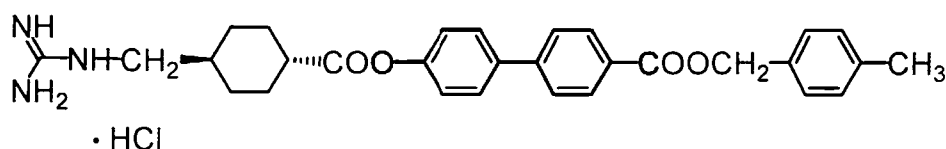


Fig. 2. Chemical structure of TG44.

TG44 は H.ピロリに対して高い選択毒性を示したが、水に対する溶解性が極めて低い (0.036 mM, 25 °C)、経口剤への応用を企図するには水溶性の改善が必要であると考えられた。そこで、各種固溶体や添加剤を用いて TG44 の溶解度の改善を検討した結果、シクロデキストリン (特に、 β -シクロデキストリン) で顕著な効果が認められた。シクロデキストリン (以下、CyD と略記する) は、デンプンに CyD 生成酵素 (CyD glycosyltransferase) を作用させて得られる環状のマルトオリゴ糖であり、これまでに 6-12 個の D-glucopyranose が α -1,4 グリコシド結合で環状に連なった同族体が単離されている。¹⁷⁾ これら同族体の中で構成グルコースが 6、7、8 個のものはそれぞれ α -

β -、 γ -CyDs (Fig. 3 参照) と呼ばれ、 β -CyD が最も広く使用されている。¹⁸⁾ CyDs は分子内の疎水性空洞に種々のゲスト分子を立体選択的に取り込んで包接複合体 (inclusion complex) を形成する単分子的ホスト分子に分類される。¹⁹⁻²²⁾ このような CyDs の包接現象は、薬剤学・製剤学領域では薬物の可溶化、安定化、放出制御、バイオアベイラビリティの改善、局所刺激性の低減などに利用され、薬物投与の最適化を標榜する薬物送達システム (drug delivery system、DDS) を構築するための機能性素材として有効利用されている。²³⁻²⁵⁾ 我が国では、1991 年に α -CyD と β -CyD が日本薬局方外医薬品成分規格 (局外規) に改質剤として収載されて以来、医療用医薬品 (処方薬) への天然 CyDs の応用は十数品目に及び、一般用医薬品 (大衆薬) や医薬部外品にも添加物として広く利用されている。²⁶⁻³⁰⁾ 特に、 β -CyD は、日本、米国、欧州の三極局方に収載され、経口投与製剤に使用されている。³¹⁾

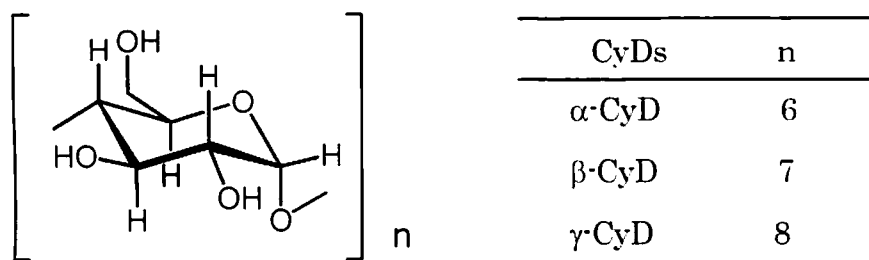


Fig. 3. Structure of cyclodextrins (CyDs)

このような背景のもと、本研究では β -CyD との包接複合体形成を利用した TG44 の製剤特性の改善を目的として、以下の検討を行った。第 1 章では、水溶液中における TG44 と β -CyD との相互作用を溶解度法、紫外吸収 (UV)、円二色性 (CD) スペクトル法、蛍光スペクトル法、核磁気共鳴 (NMR) スペクトル法を用いて複合体の安定度定数、ゲスト・ホストの化学量論と包接様式などを検討した。第 2 章では、固体状態における TG44 と β -CyD との相互作用を主に ^{13}C 固体 NMR スペクトル法を用いて検討し、ゲスト・ホストの化学量論と包接様式を明らかにした。第 3 章では、TG44/ β -CyD 固体複合体の調製法、複合体の化学量論、包接量などを検討した。第 4 章では、TG44 および TG44/ β -CyD 固体複合体の各種物性を調べた。第 5 章では、TG44 の *in vitro* 抗菌活性および H.ピロリ感染スナネズミモデルを用いて、TG44/ β -CyD 複合体の *in vivo*

除菌活性を検討した。

本研究で得られた知見を以下に詳述する。

第 1 章 水溶液中における TG44 と β -シクロデキストリンとの相互作用

第 1 節 序

溶液系は CyDs とゲスト分子の相互作用を定量的に検討できるため、包接複合体の化学構造、安定度定数、包接機構などを解明する上で重要な情報を与える。³²⁾ 溶液中における相互作用の検討にはスペクトル法（紫外吸収 (UV)、円偏光二色性 (CD)、蛍光、 ^1H -核磁気共鳴 (NMR) など）、溶解度法、反応速度法などが適用される。^{33, 34)} 特に、Higuchi らにより確立された溶解度法は操作が簡便なことから、製剤学領域では難水溶性薬物に対する可溶化剤の検索、可溶化能の比較、薬物と添加剤との相互作用の検討などに広く利用されている。また、NMR スペクトル法は、ホスト・ゲスト両分子について原子レベルでの変化を直接観察できるため、複合体の結合部位や構造研究に有用である。³⁵⁾ そこで、本章では TG44 (4-methylbenzyl 4'-[*trans*-4-(guanidimethyl)cyclohexylcarbonyloxy] biphenyl-4-carboxylate monohydrochloride) と β -CyD との相互作用を溶解度法、UV スペクトル、CD スペクトル、 ^1H -NMR スペクトル法を用いて検討し、複合体の安定度定数、ゲスト・ホスト化学量論、包接様式などを明らかにした。

第 2 節 水溶液中における相互作用

2-1 溶解度法

Fig. 4 は水溶液中における TG44 と β -CyD との相互作用を溶解度法を用いて検討した結果を示す。TG44 の溶解度 (0.036 mM at 25°C) は β -CyD 添加濃度の増加に伴い直線的に増加し (β -CyD 濃度 8 mM まで)、それ以上の高濃度では減少する、いわゆる Bs 型に類似した溶解度相図を示し、1:1 複合体形成が示唆された。そこで、溶解度相図の初期直線の傾きと切片の値を Eq. 1 を用いて解析した結果、複合体の安定度定数 (Kc) は 11,000 M^{-1} であった。また、Fig. 4 から明らかなように、

TG44 の溶解度は β -CyD 8 mM (溶解度図のプラトー領域) あるいは 15 mM (β -CyD の飽和溶解度) 添加によりそれぞれ約 70 倍および約 40 倍増大した。一般に、CyDs 複合体の化学量論は、溶解度相図のプラトー領域の長さの解析あるいは析出した固体複合体の組成分析から決定される。³⁶⁾ しかしながら、TG44 は極めて難水溶性であるため、溶解度法の実験において溶解平衡に達するまでに長時間を要すること、さらに、析出した複合体に遊離形 TG44 が混入するなどの理由により、プラトー領域の長さの解析や固体複合体の組成分析を正確に行うことは困難であった。

$$K_c = \frac{\text{slope}}{S_0(1 \cdot \text{slope})} \quad \text{Eq. 1}$$

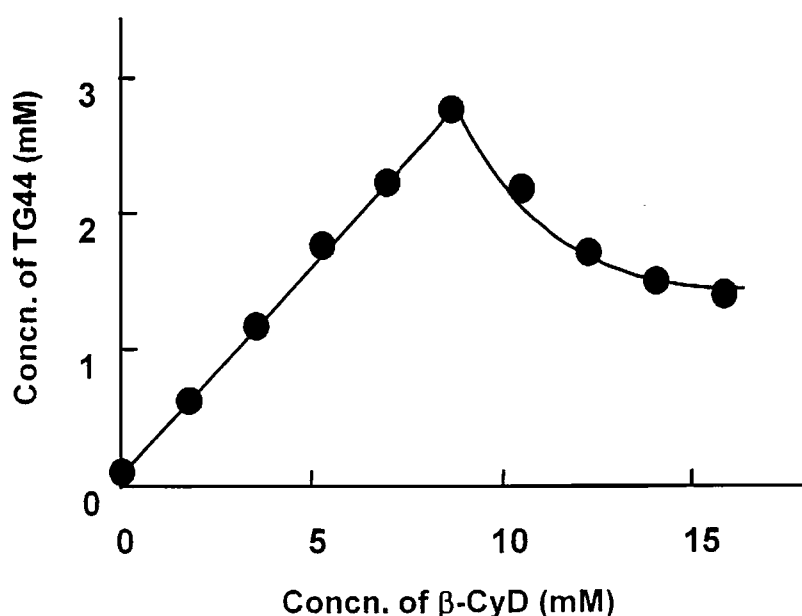


Fig. 4. Phase solubility diagram of TG44/ β -CyD system in water at 25°C.

2-2 UV 法および CD スペクトル法

Fig. 5 は TG44 の UV スペクトルに及ぼす β -CyD の影響を示す。Fig. 5 に示すように、TG44 は水溶液中において 278 nm に極大波長 (吸光係数 31,400) を与

え、その強度は β -CyD 添加により著しく増大するとともに極大波長は短波長側へ僅かにシフトした。

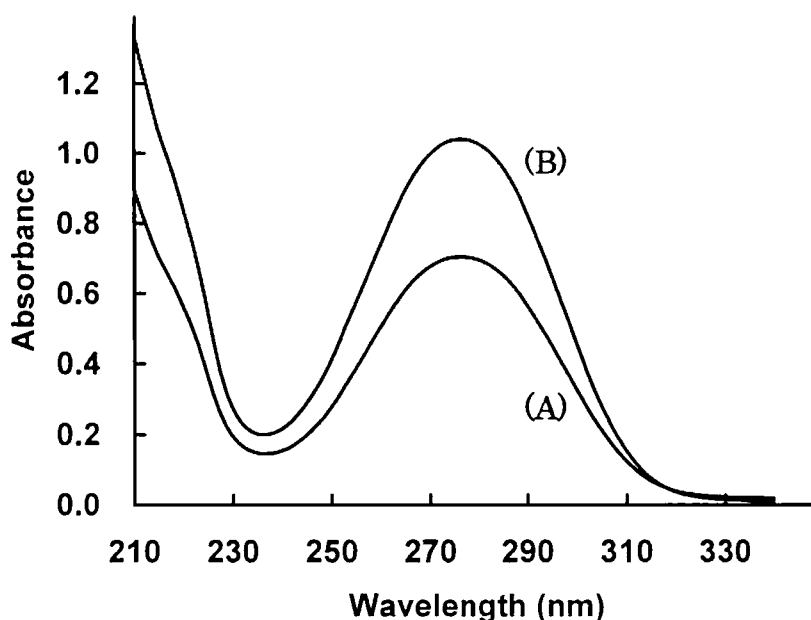


Fig. 5. Effect of β -CyD (2.2×10^{-4} M) on UV absorption spectrum of TG44 (2.2×10^{-5} M) in water at 25°C.
(A), without CyDs; (B), with β -CyD.

Fig. 6 は TG44/ β -CyD 複合体の組成比を明らかにするため、278 nm における UV 吸収強度の変化を連続変化法³⁷⁾により検討した結果を示す。連続変化法プロットは TG44/ β -CyD モル比 0.5 に最大ピークを与えたことから、TG44 は水溶液中においてモル比 1:1 複合体を形成することが示唆された。そこで、モル比 1:1 複合体形成を仮定した Scott 式 (Eq. 2)³⁸⁾を用いて 278 nm の UV 吸収強度変化を定量的に解析して、TG44/ β -CyD 複合体の安定度定数 (K_c) を算出した。

$$(a \cdot b) / d = 1 / (K_c \cdot I_c) + b / I_c \quad \text{Eq. 2}$$

ここで、 a と b はそれぞれ TG44 と β -CyD の総濃度、 I_c と d は TG44 単独と複合体としての TG44 の UV 強度の差および β -CyD 添加時の TG44 の UV 強度変化を表す。

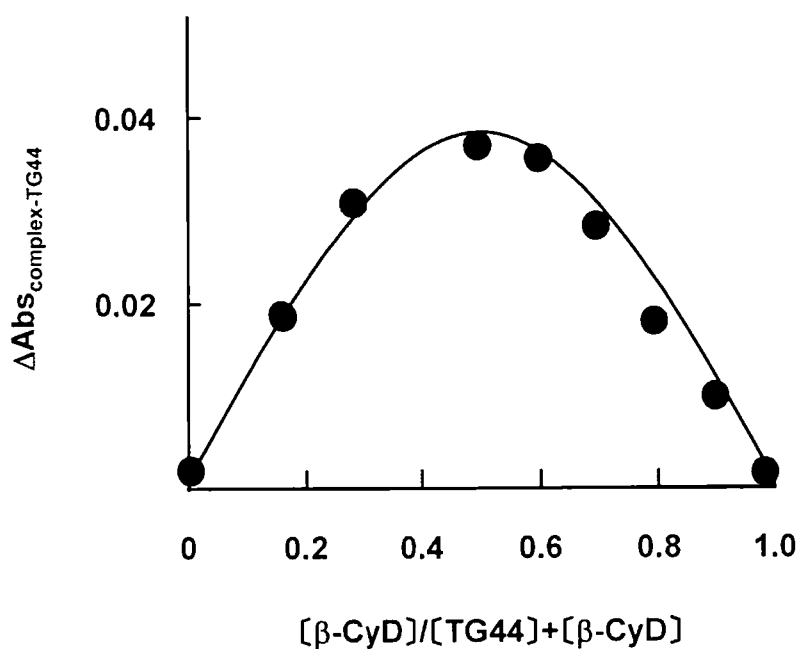


Fig. 6. Continuous variation plot for TG44/β-CyD (5.0×10^{-5} M) system in water at 25°C.

Fig. 7 に示すように、各種 β-CyD 濃度下 (0.76 ~ 3.8 mM) における TG44 の UV 強度 (278 nm) を測定し、Eq. 2 に従って b に対して $(a \cdot b)/d$ をプロットすると良好な直線 ($r = 0.994$) が得られ、1:1 複合体形成が支持された。

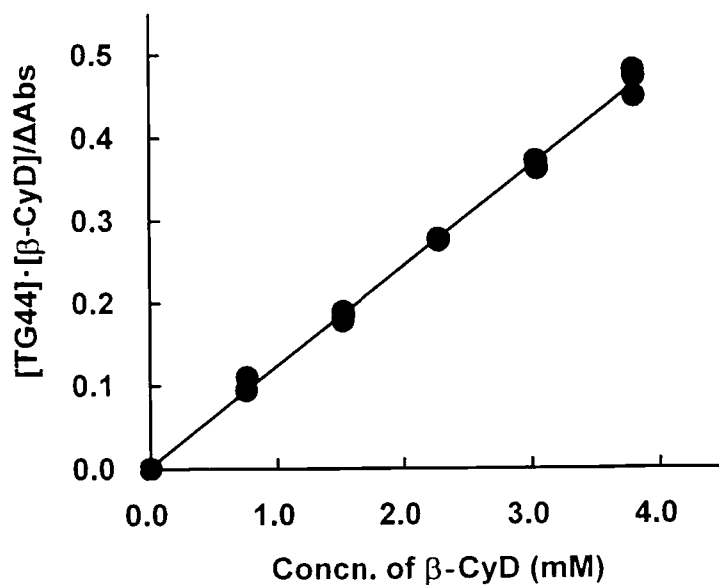


Fig. 7. Scott plot for TG44/β-CyD system in water at 25°C.

また、プロットの傾きと切片の値から算出した複合体の K_c 値は $6,900 \text{ M}^{-1}$ であった。 Fig. 8 は β -CyD 存在下における TG44 の CD スペクトルを示す。 TG44 は β -CyD 添加により 225 nm に負のコットン効果、277 nm 付近に正のコットン効果を与えた。 β -CyD はこれらの波長領域に UV 吸収を持たないことから、観察されたコットン効果は TG44 が β -CyD 不斉空洞内に包接されて出現する誘起 CD バンドであると考えられる。 TG44 は UV 領域に吸収バンドを有するが、光学不活性であるため CD スペクトルを示さない。 従って、これら UV および CD スペクトルの測定結果は、TG44 が β -CyD の不斉空洞内に位置することを示唆する。

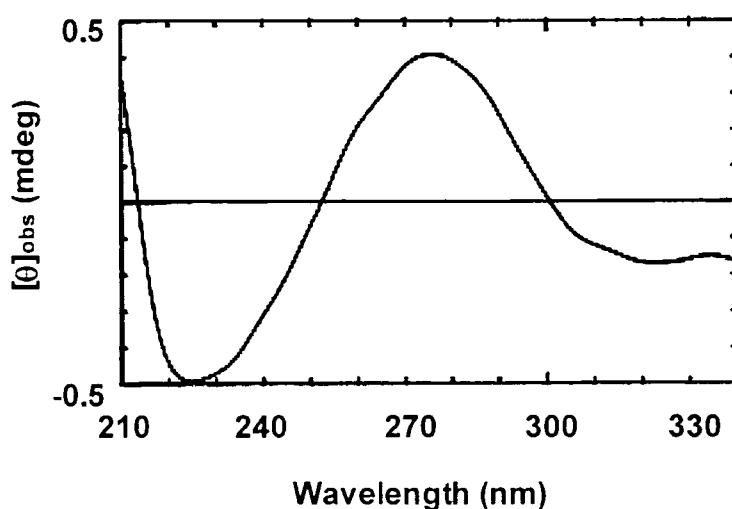


Fig. 8. CD spectrum of TG44 ($5.2 \times 10^{-5} \text{ M}$) in the presence of β -CyD ($5.2 \times 10^{-5} \text{ M}$) in water at 25°C .

2-3 蛍光スペクトル法

Fig. 9 は 25°C 、水溶液中における TG44 の蛍光スペクトルに及ぼす β -CyD の影響を示す。 TG44 は 278 nm で励起すると 370 nm に最大蛍光強度を与え、 β -CyD 添加により強度は著しく増大した。 ゲスト分子の蛍光強度は疎水環境に置かれると増大することから、TG44 は β -CyD の疎水空洞内に位置するものと推定される。 そこで、UV スペクトル法の場合と同様にモル比 1:1 複合体形成を仮定した Scott 式 (Eq. 2)³⁸⁾ を用いて蛍光スペクトル変化を解析し、TG44/ β -CyD 複合体の K_c 値を算出した。 Fig. 10 に示すように、各種 β -CyD 濃度条件 ($0.05 \sim 0.5$

mM) における TG44 の蛍光強度 (370 nm) を測定し、Eq. 2 における b に対して $(a \cdot b) / d$ をプロットすると良好な直線関係 ($r = 0.983$) が得られ、その傾きと切片の値から算出した Kc 値は 9.300 M^{-1} であった。

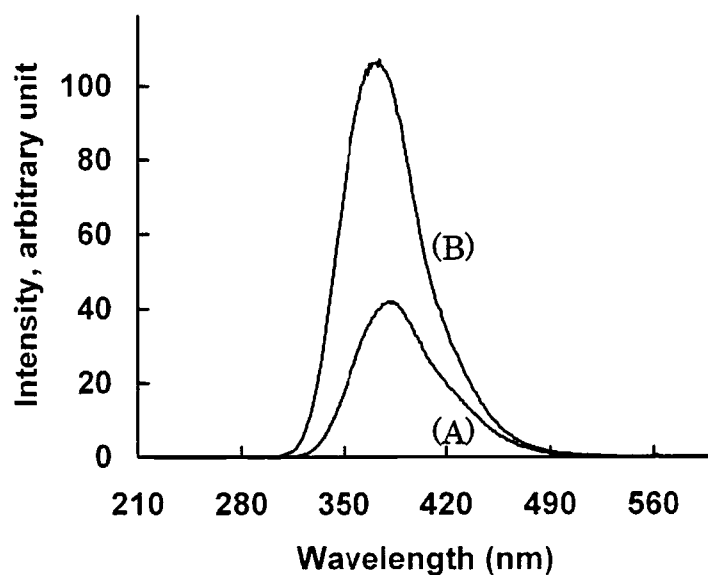


Fig. 9. Effect of β -CyD ($5.0 \times 10^{-5} \text{ M}$) on Fluorescence spectrum of TG44 ($5.0 \times 10^{-5} \text{ M}$) in water at 25°C .
(A), without CyDs; (B), with β -CyD.

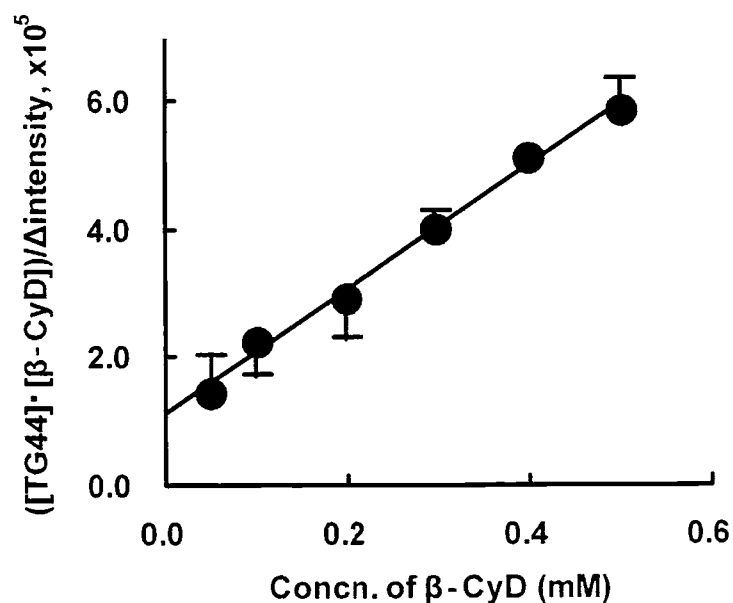


Fig. 10. Scott plot for TG44/ β -CyD system in water at 25°C .

2-4 ^1H 核磁気共鳴スペクトル法

水溶液中における TG44/ β -CyD 複合体の包接構造を明らかにするため、 ^1H -NMR スペクトル法を用いて検討した。 Fig. 11A は、 D_2O 中において β -CyD 存在下および非存在下における TG44 の ^1H -NMR スペクトルを示す。 一般に、芳香族ゲスト分子が CyDs 空洞に包接されると、空洞内部に配向した CyDs の 3 位 ($\text{H}3'$) と 5 位 ($\text{H}5'$) プロトンは、ゲスト分子の磁気遮蔽効果により高磁場シフトすることが知られている。^{39, 40)} Fig. 11A から明らかなように、 β -CyD の $\text{H}3'$ プロトンと $\text{H}5'$ プロトンは顕著に高磁場シフトし、さらに、 β -CyD の 1 級水酸基に結合する $\text{H}6'$ プロトンも高磁場シフトした。 一方、空洞外に位置する $\text{H}2'$ 、 $\text{H}4'$ プロトンはほとんど変化しなかった。 これらの結果は、TG44 が β -CyD 空洞に包接され、特に TG44 の芳香環部分が β -CyD 環の中央に位置することを示唆する。 なお、 β -CyD の 1 級水酸基に結合した $\text{H}6'$ プロトンの高磁場シフトは、TG44 が細長い鎖状分子であるため、空洞から突き出た部分の磁気的影響を受けたものと考えられる。 また、TG44 の ^1H -NMR ピークは β -CyD 複合体化により著しくブロードニングしたことから、ゲストの分子運動が著しく抑制されているものと推察される。

次に、TG44/ β -CyD 複合体の包接構造を明らかにするため、2 次元 ROESY (Rotating frame nuclear Overhauser enhancement spectroscopy) を測定した。 Fig. 11B は D_2O 中における TG44/ β -CyD 系の ROESY スペクトルを示す。 TG44 のビフェニル基の $\text{C}10$ 、 $\text{C}13$ および $\text{C}14$ プロトンは、 β -CyD 空洞内部に配向する $\text{H}3'$ と $\text{H}5'$ プロトンと相関ピークを与えた。 これらの結果は、Fig. 12 に示すように、 β -CyD が TG44 分子のビフェニル基中央を優位に包接することを示唆する。 その際、ゲスト分子のトリル基が β -CyD の 1 級水酸基側あるいは 2 級水酸基側から侵入した 2 種類の包接様式が考えられる (Fig. 12)。 しかしながら、 β -CyD 空洞の 2 級水酸基側 (空洞が広い方) に位置する $\text{H}3'$ プロトンは TG44 の $\text{C}19$ プロトンと相関ピークを与えること、また、 β -CyD の 1 級水酸基側 (空洞が狭い方) に位置する $\text{H}6'$ プロトンは TG44 の $\text{C}9$ プロトンと相関ピークを与えることから、Fig. 12A に示すような包接様式をとるものと推察される。

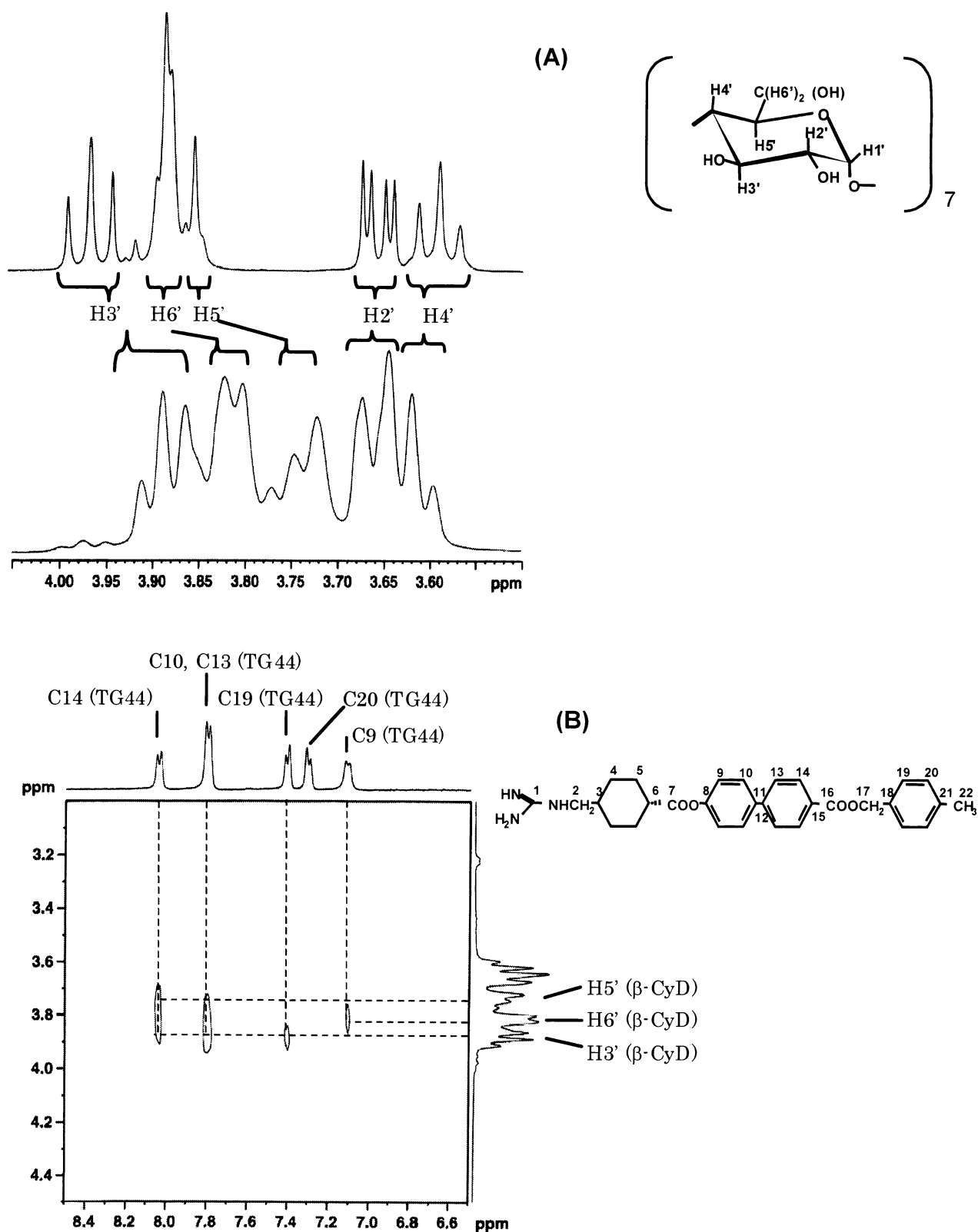


Fig. 11. (A) ^1H -NMR spectra of β -CyD (3.0×10^{-3} M) in the absence (upper) and presence (lower) of TG44 (3.0×10^{-3} M) in D_2O . (B) Partial contour plot of ROESY spectrum of TG44 (3.0×10^{-3} M)/ β -CyD (3.0×10^{-3} M) system in D_2O .

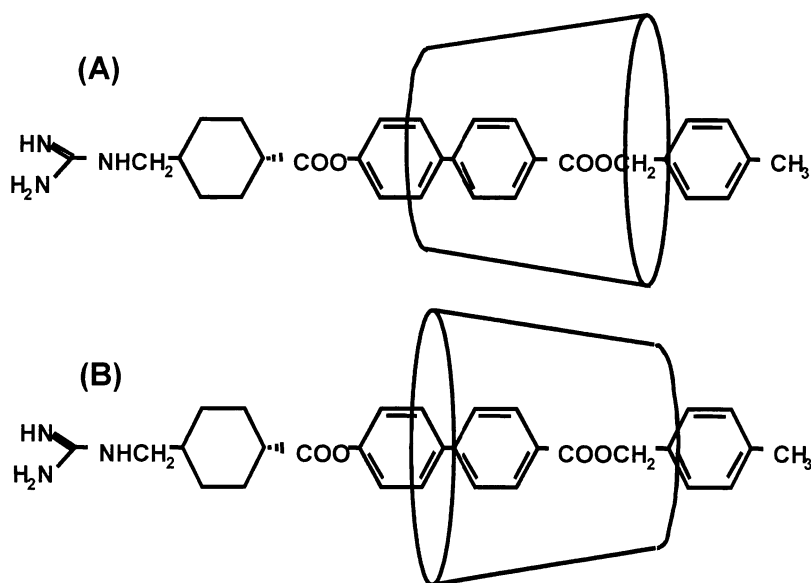


Fig. 12. (A) Proposed inclusion mode of TG44/ β -CyD complex, the methylbenzene moiety entering from the narrow primary hydroxyl side of the β -CyD cavity. (B) Proposed inclusion mode of TG44/ β -CyD complex, the methylbenzene moiety entering from the wider secondary hydroxyl side of the β -CyD cavity.

第 3 節 小括

本章では、水溶液における TG44 と β -CyD の相互作用を溶解度法、UV スペクトル法、CD スペクトル法、蛍光スペクトル法、 ^1H -NMR スペクトル法ならびに ROESY 解析を用いて検討し、TG44/ β -CyD 包接複合体形成に関する基礎的パラメータを得るとともに包接部位の推定を行った。以下に得られた知見を要約する。

- 1) TG44 の溶解度は低濃度の β -CyD 添加により直線的に増大し、 β -CyD 高濃度では複合体が析出する Bs 型相図を示した。Bs 型相図の初期直線部分から求めた 1:1 複合体の安定度定数は $11,000 \text{ M}^{-1}$ であった。TG44 の溶解度 (0.036 mM 、 25°C) は β -CyD 8 mM (溶解度図のプラトー領域) あるいは 15 mM (β -CyD の飽和溶解度) 添加においてそれぞれ約 70 倍および約 40 倍増大した。
- 2) UV および CD スペクトルの強度、シフト、符号には、TG44/ β -CyD 相互作用の強弱やゲスト-ホスト相互作用の立体関係が反映された。 278 nm における UV 変化の連続変化法解析から TG44 は β -CyD とモル比 1:1 複合体を形成することが示唆された。また、UV スペクトル変化の Scott プロットから算出した複合体の安定度定数は $6,900 \text{ M}^{-1}$ であった。 370 nm における TG44 の蛍光強度 (励起波長 278 nm) は β -CyD 添加により著しく増大し、Scott 式から求めた 1:1 複合体の安定度定数は $9,300 \text{ M}^{-1}$ であり、UV 法から求めた値とほぼ一致した。
- 3) ^1H -NMR スペクトルならびに ROESY スペクトルの検討から、水溶液中において β -CyD は TG44 のビフェニル基部分を包接し、その際 TG44 のトリル基が β -CyD の 1 級水酸基側から侵入した包接様式が示唆された。

以上の結果から、TG44 は水溶液中において β -CyD と 1:1 包接複合体を形成することが確かめられた。また、 β -CyD は TG44 のビフェニル基部分を優位に包接し、TG44 の水への低い溶解性を顕著に改善することが明らかとなった。

第2章 固体状態における TG44 と β -シクロデキストリンとの相互作用

第 1 節 序

前章では、水溶液中における TG44 と β -CyD との包接複合体形成を検討した。そこで、本章では固体状態における TG44 と β -CyD との相互作用を赤外吸収スペクトル (IR)、質量スペクトル (MASS)、粉末X線回折、熱分析および ^{13}C 固体 NMR スペクトルを用いて検討した。なお、固体複合体は、次章 (第 3 章) で述べるように、TG44 と β -CyD をモル比 1:1 でボールミル法を用いて混合粉碎して調製した。

第 2 節 固体状態における相互作用

2-1 赤外吸収スペクトル法

Fig. 13 は、TG44 単独あるいは TG44/ β -CyD (1:1) 複合体の IR スペクトル (KBr 法) を示す。TG44 は 1743 および 1700 cm^{-1} にカルボニル基の伸縮振動に基づく吸収ピークを与えた。一方、TG44/ β -CyD 複合体の場合、TG44 カルボニル基の吸収ピークは TG44 単独に比べてブロードニングし、それぞれ 1754 および 1717 cm^{-1} に高波数シフトした。カルボニル基の伸縮振動は水素結合すると低波数シフトすることから、⁴¹⁾ これらの高波数シフトは、複合体形成により TG44 の分子間水素結合が切断され、ゲスト分子が β -CyD 空洞に単分子分散したことを示す。

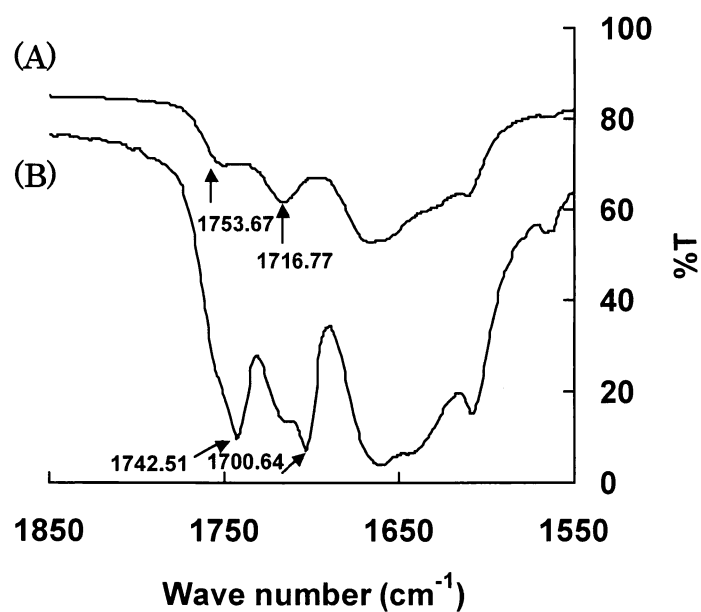


Fig. 13. FT-IR spectra of 1:1 TG44/β-CyD complex (A) and TG44 alone (B).

2-2 質量スペクトル法

Fig. 14 は TG44/β-CyD (1:1) 複合体の MASS スペクトルを示し、Table 4 に主な m/z 値をまとめた。TG44 単独は分子量に相当する m/z 500 に親イオンピークを与えた。一方、複合体は m/z 1634 に親イオンピークを与え、このピークは 1:1

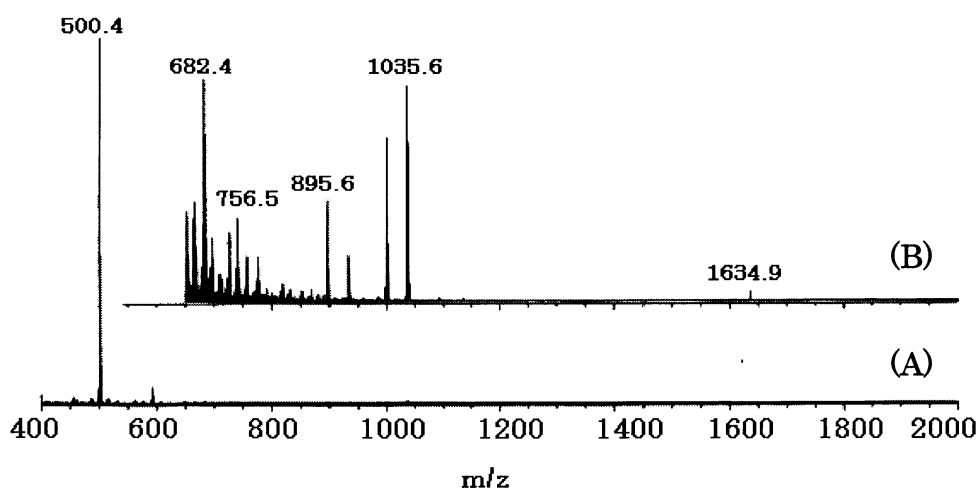
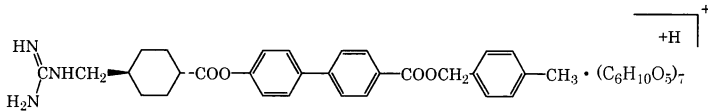
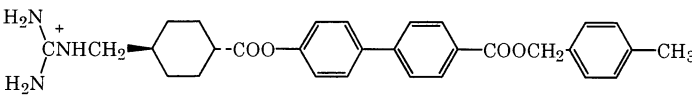
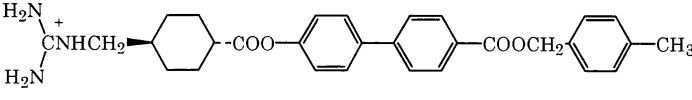


Fig. 14. FAB-MASS spectra of TG44 (A) and its β-CyD (B) complex in positive ion mode in glycerol.

TG44/ β -CyD 複合体の分子量と一致した。これらの結果は、TG44 が固体状態において β -CyD とモル比 1:1 複合体を形成することを示唆する。

Table 4. Positive-FAB mass spectral assignment of major ion peaks of TG44 and TG44/ β -CyD complex in glycerol.

	m/z	Assignment
TG44/ β -CyD Complex	1634	
	500	
TG44	500	

2-3 粉末X線回折法

Fig. 15 は TG44/ β -CyD (1:1) 系の粉末 X 線回折パターンを示す。TG44 単独は回折角 (2θ) = 13.6°、21.2°、22.0°、25.0°、28.8°、 β -CyD 単独は 2θ = 11.0°、11.9°、12.8°、15.1°、17.5°、18.0°、19.1°、19.9°、21.1° に特徴的な回折ピークを与えた。TG44/ β -CyD (1:1) の物理的混合物の回折パターンは TG44 および β -CyD の各回折パターンの単純な和として観察されたが、TG44/ β -CyD 複合体ではこれらのピークは消失し halo (ハロー) を呈した。第 3 章で述べるように、噴霧乾燥法により調製した TG44/ β -CyD 複合体も同様のハローを与えた。これらの結果は、TG44 が β -CyD と非晶質性の 1:1 固体複合体を形成することを示唆する。

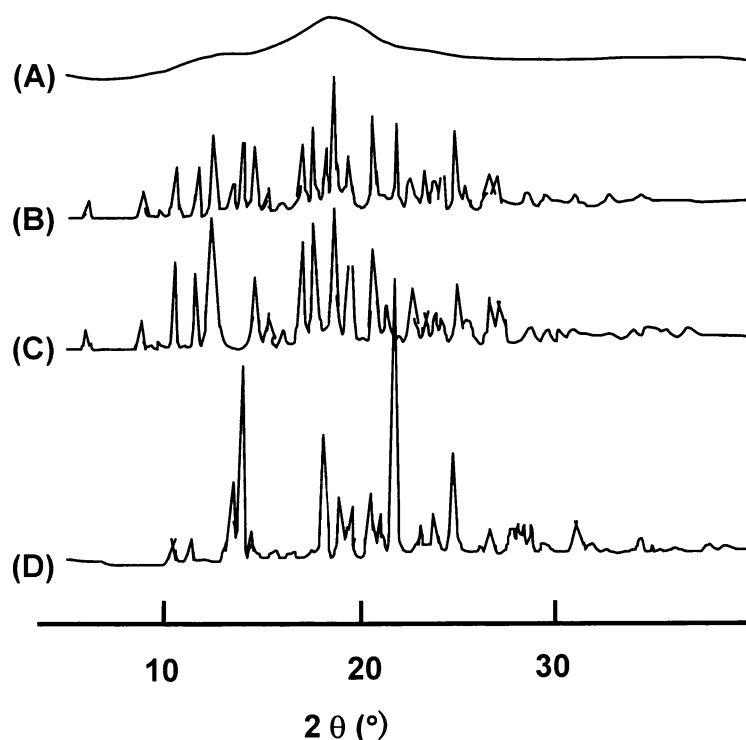


Fig. 15. Powder X-ray diffractograms of TG44/ β -CyD system. (A), TG44/ β -CyD complex prepared by the cogrinding method in a molar ratio of 1:1; (B), physical mixture of TG44 and β -CyD in a molar ratio of 1:1; (C), β -CyD alone; (D), TG44 alone.

2-4 熱分析法

Fig. 16A は種々の組成比で調製した TG44/ β -CyD 2 成分系複合体の 示差走査熱量 (DSC) 測定結果を示す。TG44 は 153°C と 184°C にそれぞれ相転移および融解に基づく吸熱ピークを与えた。これらの吸熱ピークは複合体中の β -CyD 量の増加につれて低温側にシフトするとともに、その強度は減少し、TG44/ β -CyD モル比 1:1 で消失した。これらの結果は、TG44 が β -CyD と固体状態においてモル比 1:1 複合体を形成することを示唆する。

Giordano らは、過剰量のゲスト分子を含む複合体の DSC を測定し、Eq. 3 を用いて固体複合体の組成比を決定する方法を報告している。⁴²⁾

$$\text{FGMF} = \text{TGMF} (1 + R) - R \quad \text{Eq. 3}$$

ここで、FGMF (free mole fraction of guest) は試料中の複合体を形成していないゲスト分子のモル分率であり、DSC の融解エンタルピーから算出することができる。TGMF と R は試料中の総ゲスト分子のモル分率および複合体の化学量論を示す。Fig. 16B は、TG44/ β -CyD 系の DSC 曲線から融解エンタルピーを測定して算出した FGMF を Eq. 3 に従ってプロットした結果を示す。

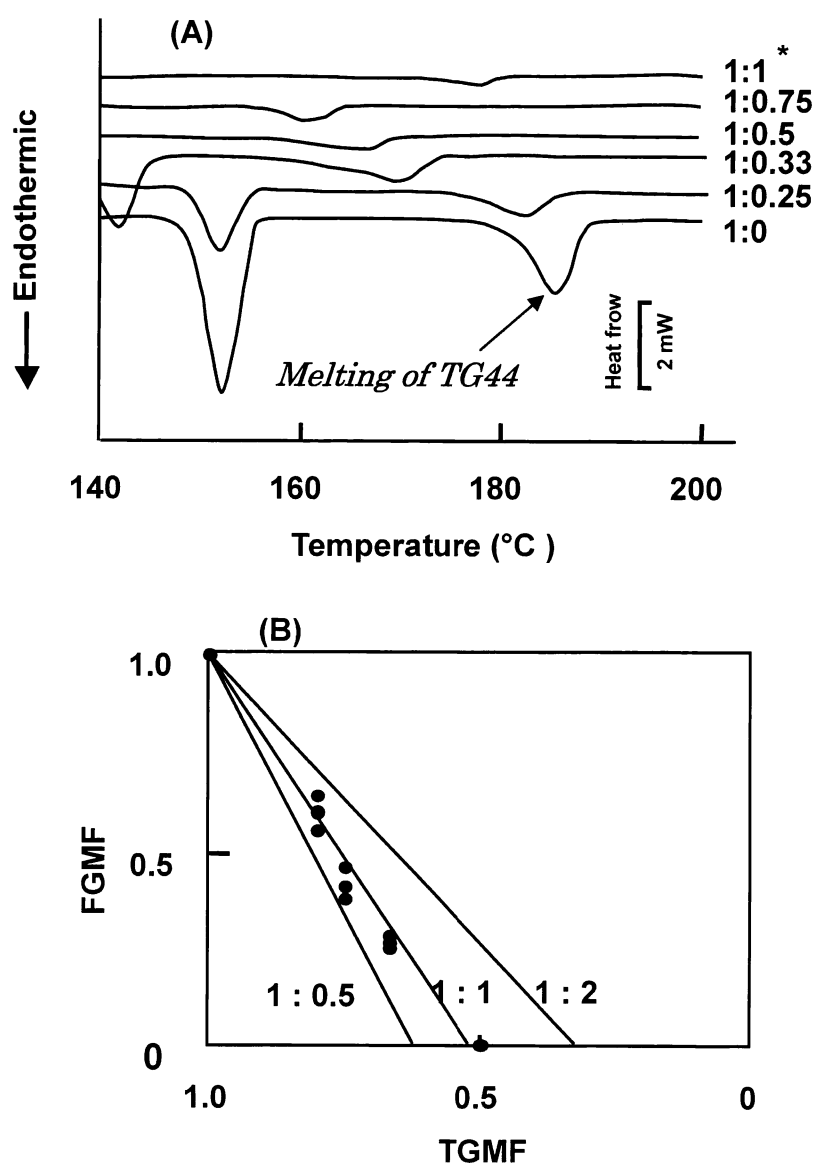


Fig. 16. DSC Thermograms (A) of ground TG44/ β -CyD products with different molar ratios and its Giordano plot (B).

*: Molar ratio of TG44/ β -CyD.

なお、TG44 の融点は β -CyD 添加により変化しないため、TG44 の融解エンタルピー (13.73 kJ/mol) は一定であると仮定した。 Fig. 16B 中の直線は複合体の化学量論 (TG44/ β -CyD) をそれぞれ 2:1 ($R = 2$)、1:1 ($R = 1$)、1:2 ($R = 0.5$) と仮定してプロットしたものである。 図から明らかなように、TG44/ β -CyD 系は $R = 1$ の理論直線に良く一致することから、固体状態でモル比 1:1 複合体を形成するものと推測された。

2-5 ^{13}C 固体 NMR スペクトル法

前述の粉末 X 線回折や熱分析から TG44 と β -CyD はモル比 1:1 の非晶質性複合体を形成することが示唆されたが、ホスト-ゲスト相互作用の詳細を解明するのは困難であった。 そこで、 ^{13}C 固体 NMR スペクトルを用いて固体状態における TG44 と β -CyD との相互作用を検討した。

Fig. 17 は本研究で用いた 2D ^{13}C - ^1H HETCOR (Heteronuclear correlation) スペクトル測定のパルスシーケンスを示し、各スペクトルは種々の磁化移動時間 (コンタクト時間、60 μs , 500 μs , 1500 μs) で測定した。 Fig. 18 は、TG44、 β -CyD および TG44/ β -CyD 1:1 複合体の ^{13}C CP/MAS (Cross polarization/magic angle spinning) NMR スペクトルを示す。 TG44 と β -CyD の炭素シグナルは 1D ^{13}C - ^1H HETCOR スペクトルに基づき帰属した。 なお、TG44 のビフェニル基部分とトリル基部分の各炭素シグナルはオーバーラップするため、それらの帰属は困難であった。 また、 β -CyD の C2、C3、C5 炭素も互いにオーバーラップした。 Fig. 18 から明らかなように、TG44 の各炭素 (C17を除く) は β -CyD と異なる磁場に炭素シグナルを与えた。 TG44 および β -CyD の化学シフト値は複合体形成による影響をほとんど受けなかった。 一方、TG44 単独および β -CyD 単独の各炭素は鋭いシグナルを与えたが、複合体形成により各シグナルは著しくブロードニングした。 このブロードニングは、複合体形成によりゲスト、ホスト両分子の分子運動が著しく抑制されること、あるいは固体複合体が非晶質であるため、配向が異なる種々の複合体が混在することなどに起因するものと推察される。

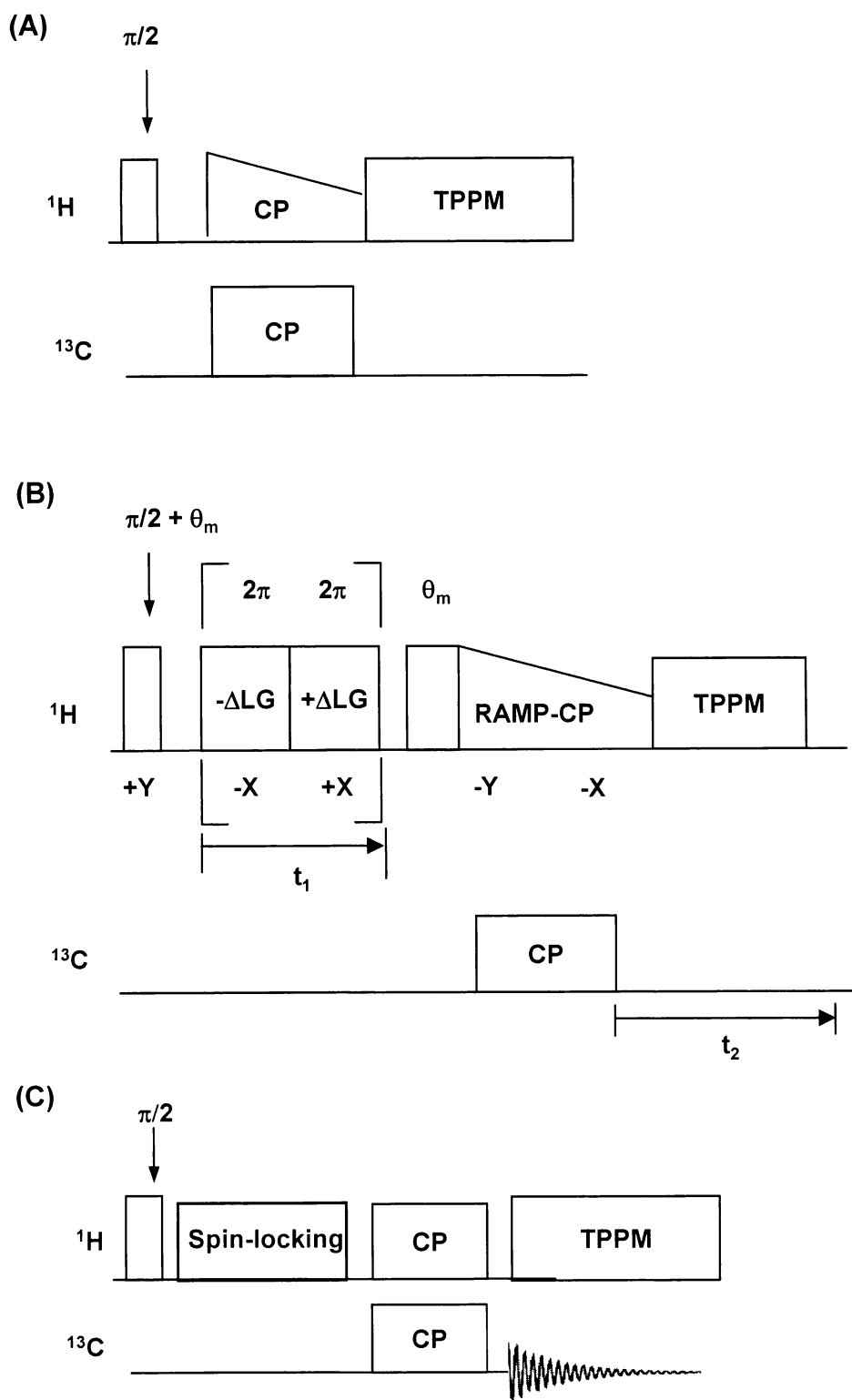


Fig. 17. Pulse sequences for 1D CP/MAS ^{13}C -NMR spectra (A), for 2D heteronuclear correlation NMR spectra (B) with frequency-switched Lee-Goldburg irradiation during the evolution, and for determination of $T_{1\rho}^{\text{H}}$ values (C).

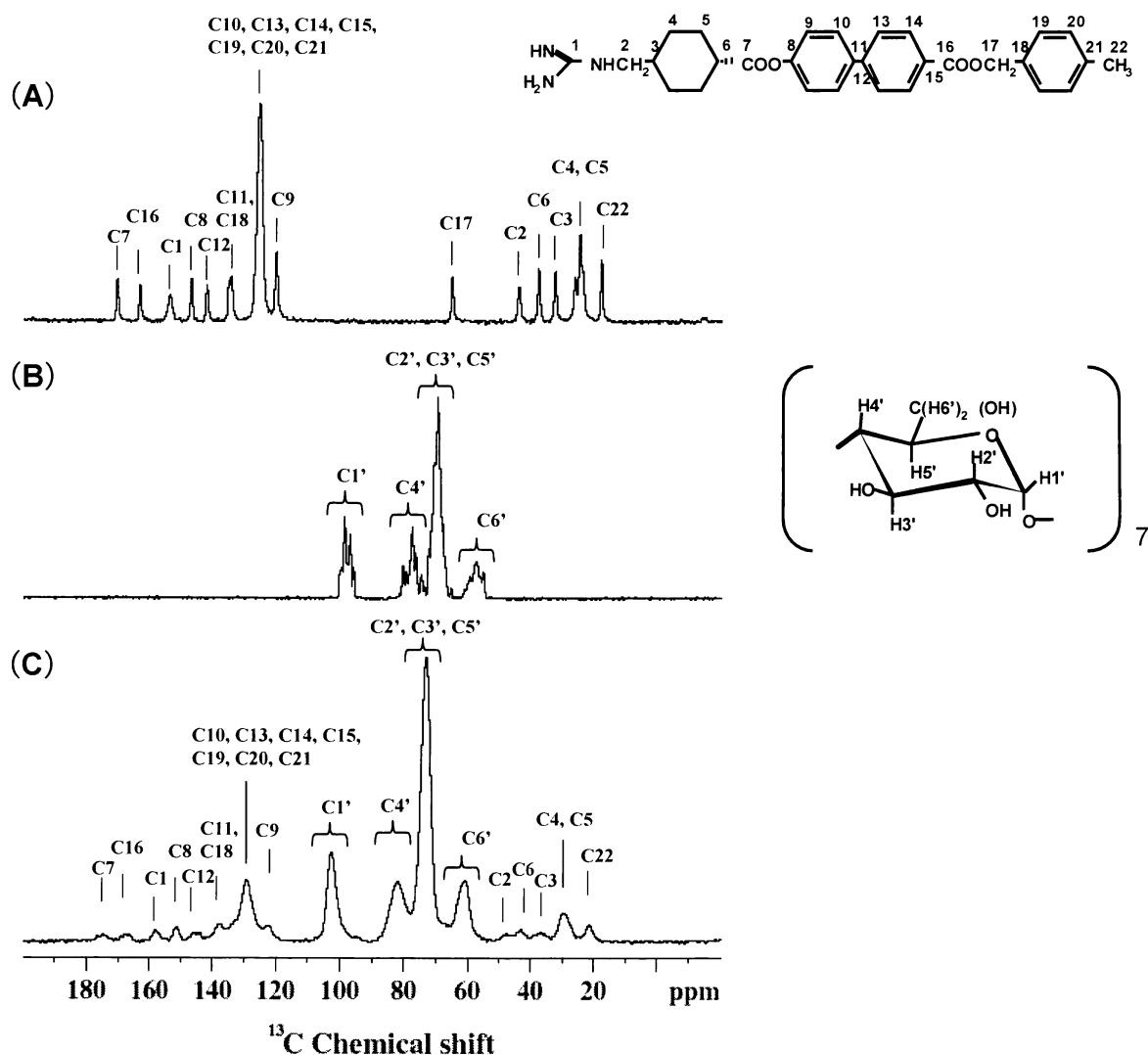


Fig. 18. ^{13}C CP/MAS NMR spectra of (A) TG44, (B) β -CyD and (C) TG44/ β -CyD (1:1) complex.

CyD 複合体を加熱すると CyD 空洞外に位置するゲスト分子の残基は分子運動が増大して ^{13}C 固体 NMR スペクトルシグナルが先鋭化するが、空洞内に包接された残基は分子運動が制限されているため、シグナルの先鋭化はほとんど見られないことが知られている。⁴³⁾ そこで、加熱に伴う複合体の ^{13}C 固体 NMR スペクトル変化を検討した。 Fig. 19 は、 25°C と 80°C で測定した TG44/ β -CyD複合体の ^{13}C CP/MAS NMR スペクトルを示す。 TG44 のシクロヘキシル基の C6 炭素、メチレン炭素 (C17)、トリル基の C22 炭素のシグナルは温度上昇に伴い先鋭化した、ビフェニル基炭素の変化はわずかであった。 これらの結果は、固体状態において

β -CyD が TG44 のビフェニル基を優位に包接して、その分子運動を著しく抑制していることを示唆する。一方、 β -CyD 炭素のシグナルはほとんど変化しなかったことから、 β -CyD が大環状構造であるため、今回の測定条件下では顕著な影響を受けなかったものと考えられる。

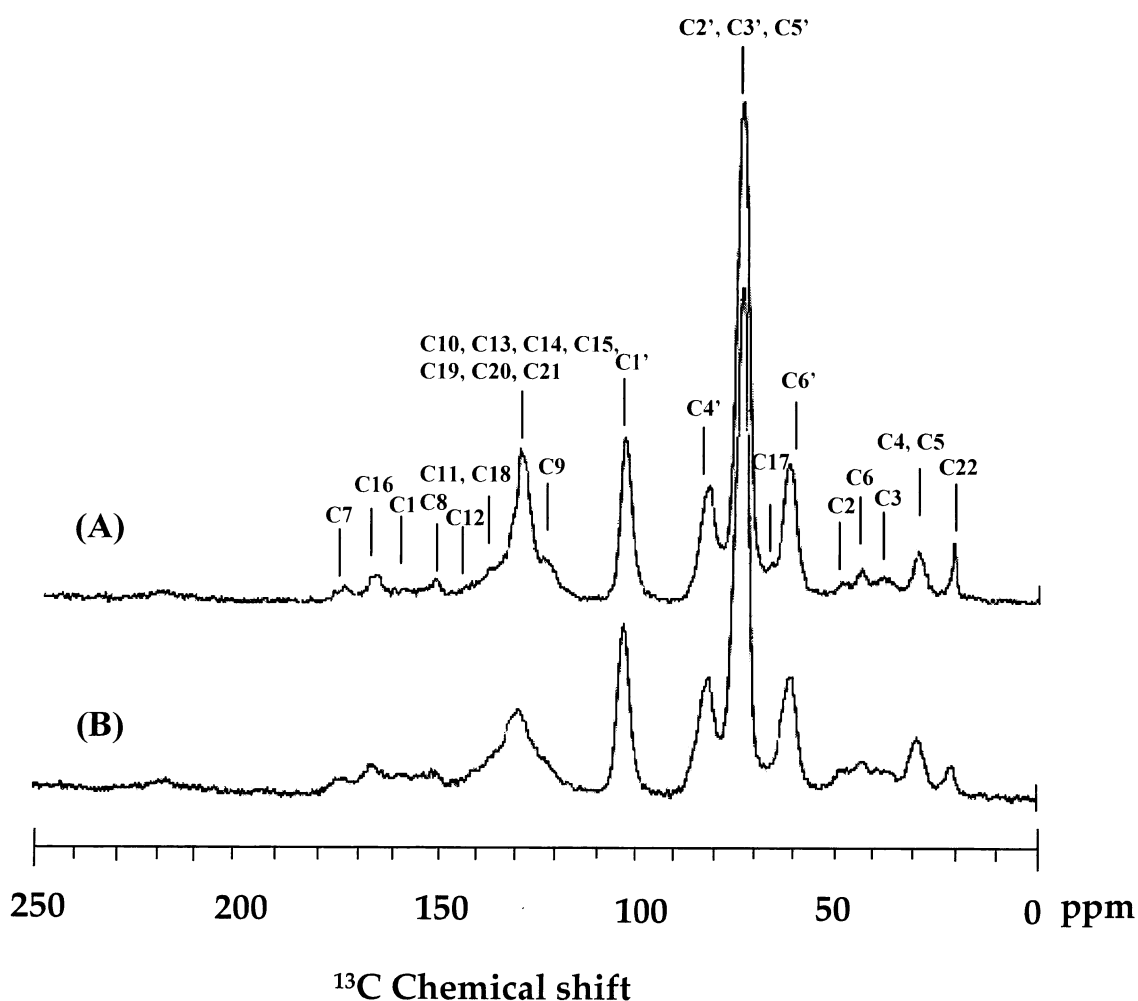


Fig. 19. ^{13}C CP/MAS NMR spectra of TG44/ β -CyD (1:1) complex at 80 °C (A) and 25 °C (B).

$T_{1\rho}^H$ (プロトンのスピン-格子緩和時間) 値はポリマーの分子間相互作用に関する有益な情報を与えることが知られている。^{44), 45)} Table 5 は Fig. 17(C) のパルスシーケンスを用いて測定した TG44/ β -CyD 複合体 (1:1) の各炭素の $T_{1\rho}^H$ 値を示す。 β -CyD の各炭素 (C1' - C6') の $T_{1\rho}^H$ 値はほぼ同一の値 (4.2 - 4.3 ms) を示した。

また、TG44 のビフェニル部分および末端ベンゼンの炭素の $T_{1\rho}^H$ 値は β -CyD の炭素とほぼ同一の値 (4.1 ms) を示したが、TG44 の他の炭素の $T_{1\rho}^H$ 値はいずれも短い値 (2.4 - 3.2 ms) を示した。これらの結果は、TG44 の芳香環プロトンと β -CyD 間でプロトンのスピン拡散が $T_{1\rho}^H$ 緩和時間内で効率的に進行すること、一方、TG44 のシクロヘキシル部分と β -CyD 間ではスピン拡散が無視できる程度であることを示す。従って、これらの $T_{1\rho}^H$ の結果は、 β -CyD は TG44 の芳香族 (主にビフェニル部分) と相互作用していることを示す。

Table 5. $T_{1\rho}^H$ values of each carbon of TG44/ β -CD complex.

Carbon No.	C7	C16	C1	C8	C12	C11, 18	C10, 13,14, 15,19, 20,21	C9	C1'
Chemical shifts/ppm	174	167	158	151	146	138	129	122	103
$T_{1\rho}^H$ /ms	N.D.	N.D.	3.2	3.1	3.0	3.2	4.1	4.1	4.2

Carbon No.	C4'	C2',3', 5'	C17	C6'	C2	C6	C3	C4,5	C22
Chemical shifts/ppm	95	82	73	61	48	43	36	29	21
$T_{1\rho}^H$ /ms	4.2	4.3	N.D.	4.2	N.D.	2.9	2.8	3.8	2.4

N.D.; these values could not be determined, because the intensities of these resonance were low.

Fig. 20 は種々のコンタクト時間で測定した TG44/ β -CyD 1:1 複合体の 2D ^{13}C - ^1H HETCOR スペクトルを示す。2D HETCOR はコンタクト時間が短い場合、直接結合した ^{13}C - ^1H 対の相関のみが観察される。Table 6 は短コンタクト時間 (60 μs) で測定して帰属した TG44 ならびに β -CyD 炭素に結合したプロトンの化学シフト値を示す。 ^1H NMR スペクトルにおいて、TG44 のシクロヘキシル部分 (H4、H5 と H6)、ビフェニル部分 (H9 と H10、H13、H14) ならびにトリル部分 (H19、

H20 と H22) のプロトンのシグナルは各々 (1.1 - 2.8 ppm と 1.9 - 3.1 ppm)、(6.9 - 8.0 ppm と 7.0 - 8.4 ppm)、(8.7 - 9.6 ppm と 1.4 - 2.2 ppm) に観測された。一方、 β -CyD のプロトンのシグナルは各々 4.7 - 6.0 ppm (H6'), 3.1 - 5.0 ppm (H2', H3', H5'), 3.2 - 4.6 ppm (H4'), 3.3 - 5.2 ppm (H6') に観測された。

Table 6. ^1H Chemical shifts of TG44 and β -CyD.

Proton No.	H2	H3	H4, 5	H6	H9	H10, 13, 14	H17
Chemical shifts/ppm	2.5 - 3.3	1.2 - 1.9	1.1 - 2.8	1.9 - 3.1	6.9 - 8.0	7.0 - 8.4	3.0 - 5.2

Proton No.	H19, 20	H22	H1'	H2', 3', 5'	H4'	H6'
Chemical shifts/ppm	8.7 - 9.6	1.4 - 2.2	4.7 - 6.0	3.1 - 5.0	3.2 - 4.6	3.3 - 5.2

さらに、コンタクト時間を増加させた場合 (Fig. 20(B), (C))、TG44 の炭素 (128 - 130 ppm) と β -CyD の水素 (2.7 - 4.1 ppm) 間、TG44 の C17 炭素 (63 - 66 ppm) と β -CyD の水素 (4.1 ppm) 間に新たな相関ピークが観察された。ここで、30 ppm の炭素シグナルと 3 ppm の水素のシグナル間で観察される相関ピークは、TG44 の炭素ピークのブロードニングによるものである。また、これらの分子間相関ピークは、コンタクト時間 1500 μs における ^{13}C - ^1H HETCOR スペクトル (Fig. 20(C)) ではさらに明瞭に観察された。すなわち、高い分子間相関ピークは芳香族炭素 (ビフェニル炭素: C10、C13、C14、C15、トリル炭素: C19、C20、C21) と β -CyD の水素間や TG44 のビフェニル水素 (7 ppm) と β -CyD の炭素 (C2、C3、C5、72 - 77 ppm) 間で観察された。

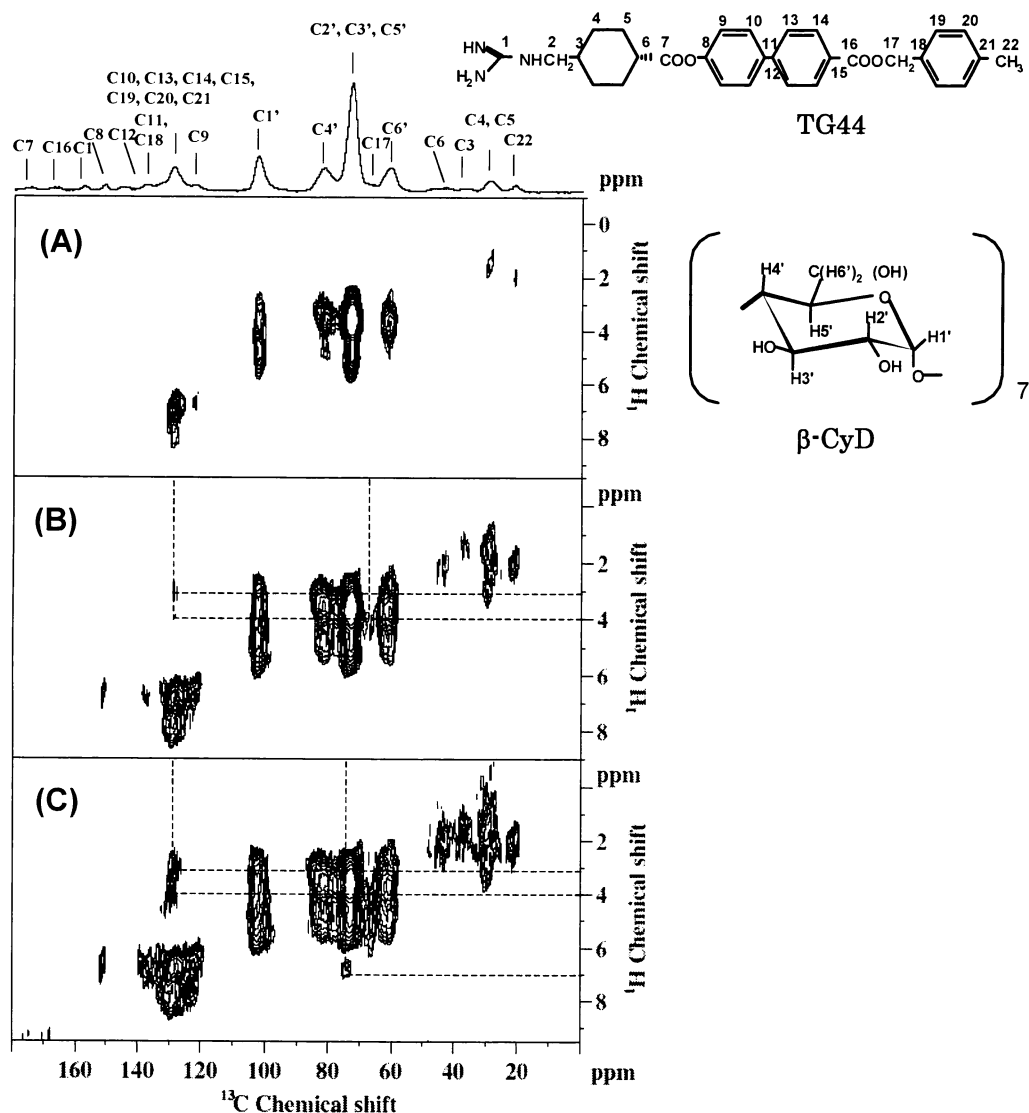


Fig. 20. 2D FSLG ^1H - ^{13}C HETCOR spectra of TG44/ β -CyD (1:1) complex, measured with different contact times of 60 μs (A), 500 μs (B) and 1500 μs (C).

Fig. 21 は、Fig. 20 の縦軸の 7 ppm に添ってスライスした 1D スペクトル図を示す。TG44 のビフェニル水素は β -CyD の C2、C3、C5 炭素と 72・77 ppm に明らかな相関ピークを与え、この結果はビフェニル基部分が β -CyD の空洞に包接されていることを示す。なお、他の磁場領域において上記相関ピーク以外の分子間ピークは観察されなかった。以上の固体 NMR スペクトルならびに水溶液中における ROESY スペクトル結果から推定した TG44/ β -CyD 1:1 複合体の包接様式を Fig. 22 に示す。固体ならびに水溶液中において β -CyD は TG44 のビフェニル基部分

を優位に包接することが明らかとなった。

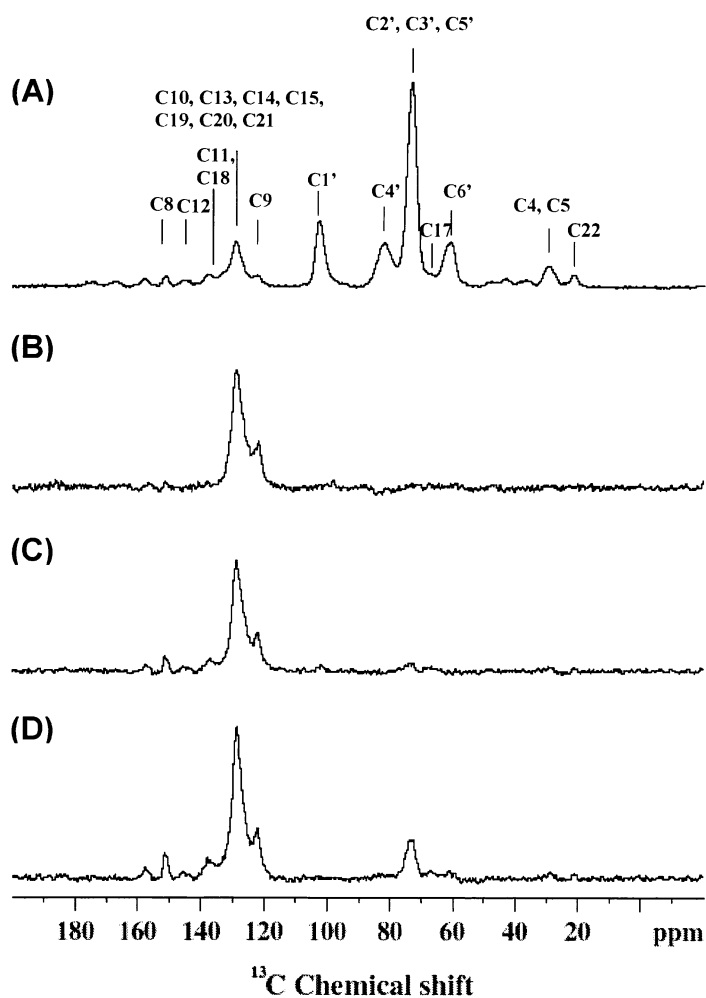


Fig. 21. ^{13}C CP/MAS NMR spectrum (A) of TG44/ β -CyD (1:1) complex, and 1D slices along the horizontal axis of the FSLG ^1H - ^{13}C HETCOR spectra (Fig. 20) taken at 7 ppm on the ^1H chemical shift axis, measured at contact times of 60 μs (B), 500 μs (C) and 1500 μs (D).

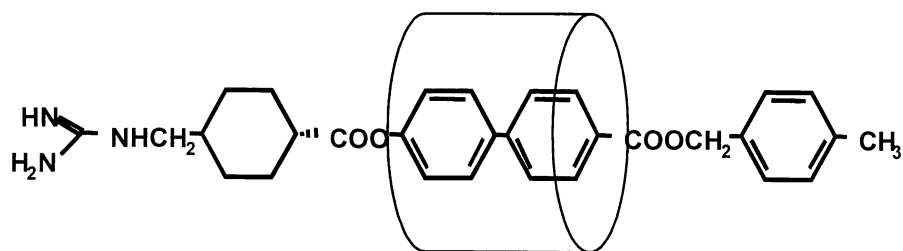


Fig. 22. Proposed inclusion mode of TG44/ β -CyD complex in the solid state.

第 3 節 小括

本章では、固体状態における TG44 と β -CyD の相互作用を粉末 X 線回折、熱分析、IR、MASS および ^{13}C 固体 NMR スペクトルを用いて検討し、TG44/ β -CyD 包接複合体形成に関する基礎的パラメータを得るとともに包接部位の推定を行った。以下に得られた知見を要約する。

- 1) TG44/ β -CyD 複合体の粉末 X 線回折を測定した結果、TG44 由来の回折ピークは β -CyD との 1:1 複合体形成に伴い消失した。IR スペクトルにおいて、TG44 のカルボニル伸縮振動 (1700 cm^{-1} , 1743 cm^{-1}) は β -CyD 複合体化により高波数シフト (1717 cm^{-1} , 1754 cm^{-1}) し、 β -CyD 空洞内への TG44 の単分子分散が示唆された。また、MASS スペクトルにおいて、複合体は分子量に相当する $m/z\ 1634$ にピークを与えた。
- 2) TG44 と β -CyD の相互作用を DSC で検討した結果、TG44 の融解に由来する吸熱ピークは β -CyD とモル比 1:1 複合体形成により消失した。また、Giordano プロットは TG44 と β -CyD とのモル比 1:1 複合体形成を支持した。
- 3) ^{13}C 固体 NMR スペクトル (25°C) において、TG44/ β -CyD 複合体の ^{13}C シグナルは TG44 や β -CyD 単独に比べて著しくブロードニングした。 ^{13}C シグナルに対する温度の影響 (80°C) を検討した結果、TG44 のビフェニル基炭素は温度の影響を受けにくかったが、シクロヘキシル基 (C6)、メチレン炭素 (C17)、トリル基炭素 (C22) は温度上昇に伴い先鋭化した。また、TG44 の芳香族部分 (主にビフェニル部分) と β -CyD 炭素の $T_{1\rho}^H$ 値はいずれも約 4 ms の同じ値を与えることから両者は空間的に接近していることが示唆された。さらに、種々のコンタクト時間 ($60\ \mu\text{s}$ - $1500\ \mu\text{s}$) で 2D ^{13}C - ^1H HETCOR スペクトルを測定した結果、コンタクト時間の増加に伴い ($1500\ \mu\text{s}$)、TG44 の炭素 (128 - 130 ppm) と β -CyD の水素 (2.7 - 4.1 ppm) 間、TG44 の C17 炭素 (63 - 66 ppm) と β -CyD の水素 (4.1 ppm) 間に新たな相関ピークが観察された。また、7 ppm に添ってスライスした 1D スペクトルからも同様の知見が得られた。これらの

結果は、固体状態において TG44 のビフェニル基部分が β -CyD の空洞に包接されることを示唆し、水溶液中の ^1H NMR スペクトルから推定した構造を支持した。

以上の結果から、TG44 は β -CyD と固体状態において 1:1 包接複合体を形成し、その際 β -CyD は TG44 のビフェニル基を優位に包接して分子運動を著しく制限するものと推定された。特に、2D ^{13}C - ^1H HETCOR スペクトルは、ゲスト炭素とホスト水素間あるいはゲスト水素とホスト炭素間で分子間相関ピークの観測が可能なことから、非晶質性 CyD 複合体の包接様式や包接構造を推定する上で有用な手段になり得ることが確かめられた。

第3章 TG44/ β -シクロデキストリン複合体の調製

第1節 序

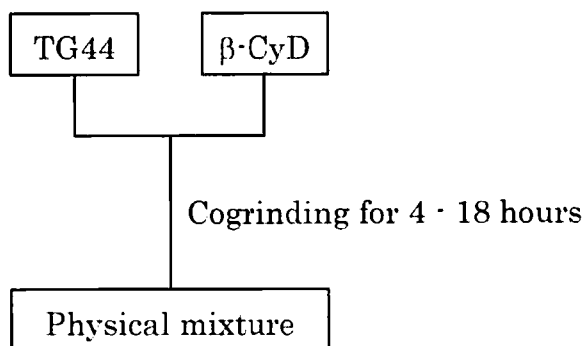
β -CyD は 7 個の D-グルコピラノースが α -1,4 結合した環状のオリゴ糖であり、医薬品をはじめ食品、化粧品、香料などに広く利用されている。特に、薬物の可溶化、安定化、バイオアベイラビリティの向上などを目的として製剤学領域で有効利用されている。³²⁾ CyD 固体複合体は様々な方法で調製され、水を溶媒に用いた共沈法、中和法、凍結乾燥法、混合溶媒を用いた混練法、噴霧乾燥法、溶媒を用いない混合粉碎法 (例えば、ボールミル法)、密封加熱法などが知られている。⁴⁶⁾ 本章では、ボールミル法および噴霧乾燥法により TG44/ β -CyD 複合体を調製し、その溶解性を検討するとともに、調製した複合体中の遊離薬物の定量法について検討を加えた。

第2節 TG44/ β -CyD 複合体の調製

2-1 ボールミル法による複合体の調製

TG44/ β -CyD のボールミル粉碎物は Fig. 23 に示す方法により調製した。すなわち、TG44 (150 g) と β -CyD (318 g) を時間 (4 ~ 18 時間) を変えてボールミルで混合粉碎した。Fig. 24 は得られた粉碎物の水に対する溶解挙動を示す。TG44 の溶解速度は粉碎時間の増加に伴い増大し、8 時間以上の粉碎物はほぼ同じ溶解挙動を示した。また、Fig. 24 から明らかなように、TG44 濃度は 0 時間 (物理的混合物、溶解度相図のプラトー領域) および 8 ~ 18 時間粉碎することにより、それぞれ約 50 倍および約 200 倍増大した。さらに、粉末 X 線回折測定の結果、0 ~ 6 時間粉碎物は TG44 に起因する回折ピークが観測されたが、8 ~ 18 時間粉碎物はハローを示した。これらのことから、TG44/ β -CyD のボールミル粉碎法による複合体の調製は混合時間と密接に関係し、8 時間以上必要であることが示唆された。

Preparation of TG44/ β -CyD complex
by cogrinding method



Cogrinding

Weight: ca. 450 g

Pot: zirconia (material)

Ball: zirconia (material). ball (shape), 25 ϕ (diameter), 60% (filling ratio)

Fig. 23. Preparation of TG44/ β -CyD complex by cogrinding method.

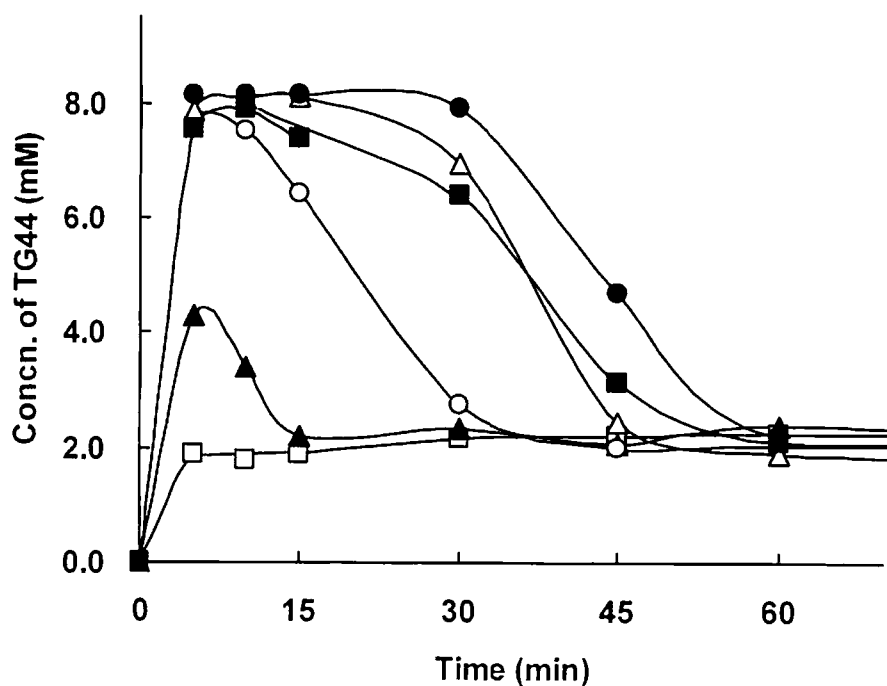


Fig. 24. Dissolution behavior of TG44/ β -CyD complex prepared by cogrinding method (grinding times: 0, 4, 6, 8, 10 and 18 hours at 25 °C).

□: 0 hour, ▲: 4 hours, ○: 6 hours, △: 8 hours, ●: 10 hours, ■: 18 hours.

Fig. 25 は調製した粉碎物を水に投入後の溶液の可視部透過率を示す。透過率の測定波長として、水溶液中において難水溶性薬物が未溶解あるいは析出した時の濁度の確認に汎用される 650 nm を用いた。Fig. 25 から明らかなように、0 および 6 時間の粉碎物の溶液は白濁して透過率は低かったが、8 時間以上粉碎した粉体は高い透過率を示した。また、8 時間と 10、18 時間処理した粉碎物を比較すると、初期(約 10 分間)において透過率に差がみられ、8 時間粉碎物の方が 10、18 時間粉碎物に比べて透過率は低かった。この結果は Fig. 24 の溶解挙動の結果とよく対応している。以上の結果から、ボールミル法により TG44/ β -CyD 複合体を調製するための粉碎時間は、10 時間に設定した。

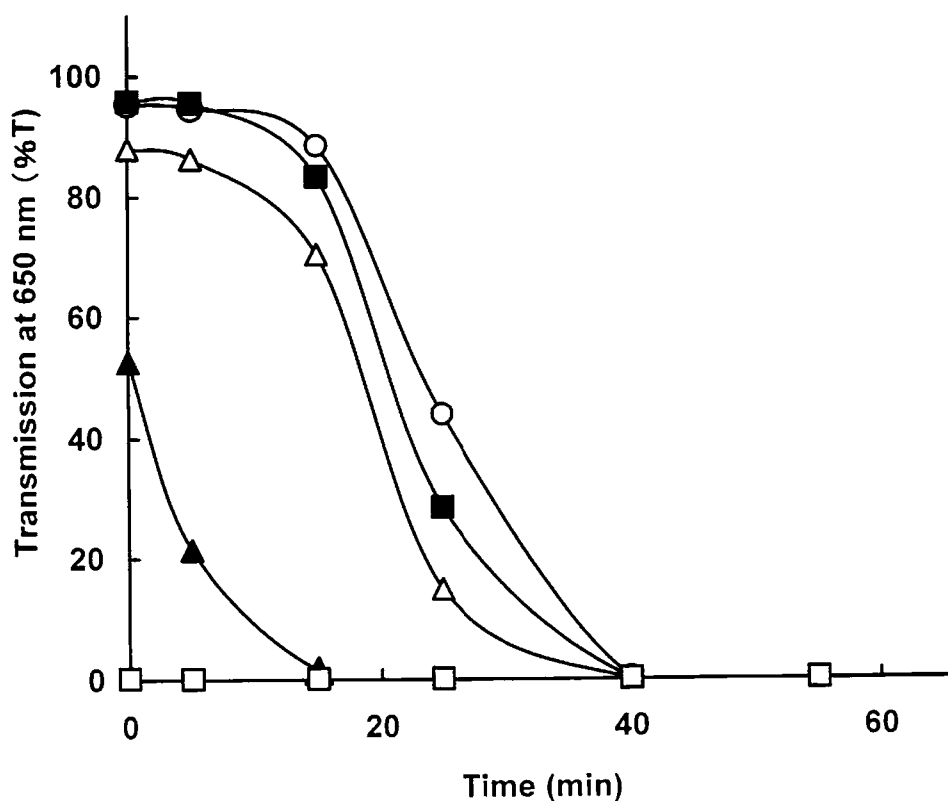


Fig. 25. Light transmission of solutions after addition of TG44/ β -CyD complex prepared by cogrinding method (grinding times: 0, 4, 6, 8, 10 and 18 hours) in water at 25 °C.

□: 0 hour, ▲: 6 hours, △: 8 hours, ○: 10 hours, ■: 18 hours.

2-2 噴霧乾燥法による複合体の調製

Fig. 26 は噴霧乾燥法によるモル比 1:1 の TG44/ β -CyD 複合体の調製法を示す。噴霧乾燥法により CyDs 複合体を調製する際の溶媒は水が最も望ましいが、TG44 は難水溶性であるため水への溶解条件に工夫を要する。そこで、噴霧水溶液の温度について検討した結果、 β -CyD 存在下 90°C で Fig. 26 に示す TG44 粉体量 (0.01 g/mL) が水に溶解すること、また、TG44 は加温水溶液中において塩酸塩の解離に伴い加水分解しやすいことから、安定化剤として微量の塩酸を添加して pH を酸性 (pH = 3.4) に保った。Fig. 27 は、噴霧乾燥法ならびに先に示したボールミル法 (10 時間粉碎) で調製した TG44/ β -CyD 複合体 (1:1) の水に対する溶解挙動および透過率を比較した結果を示す。両方法で調製した複合体は類似の溶解挙動を示し、複合体の $^1\text{H-NMR}$ スペクトル、CD スペクトル、粉末 X 線回折および IR スペクトルも類似していた。

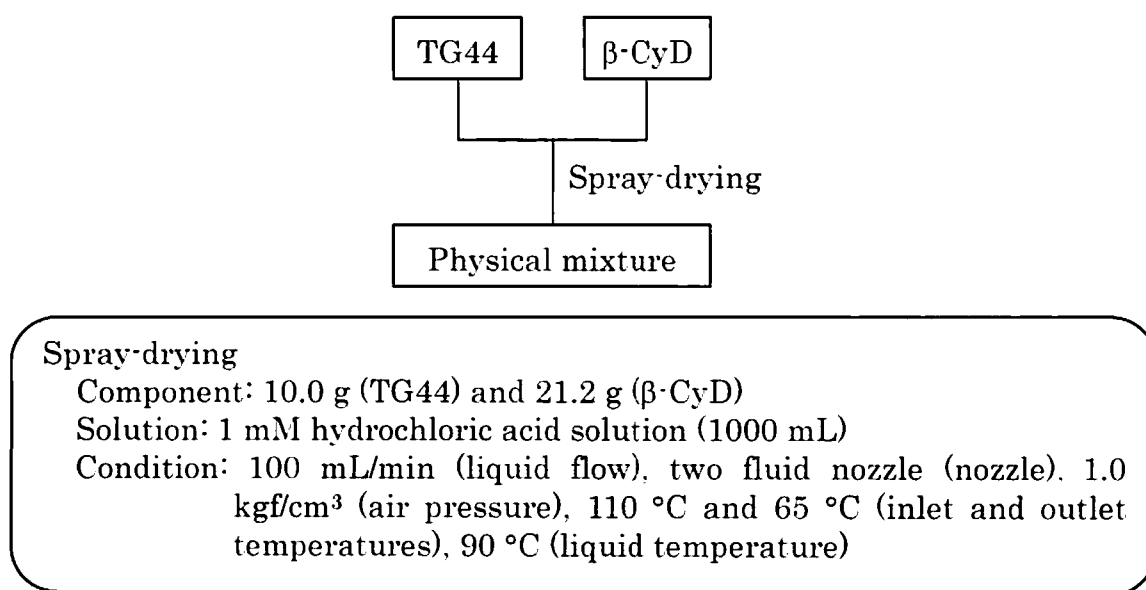


Fig. 26. Preparation of TG44/ β -CyD complex by spray-drying method.

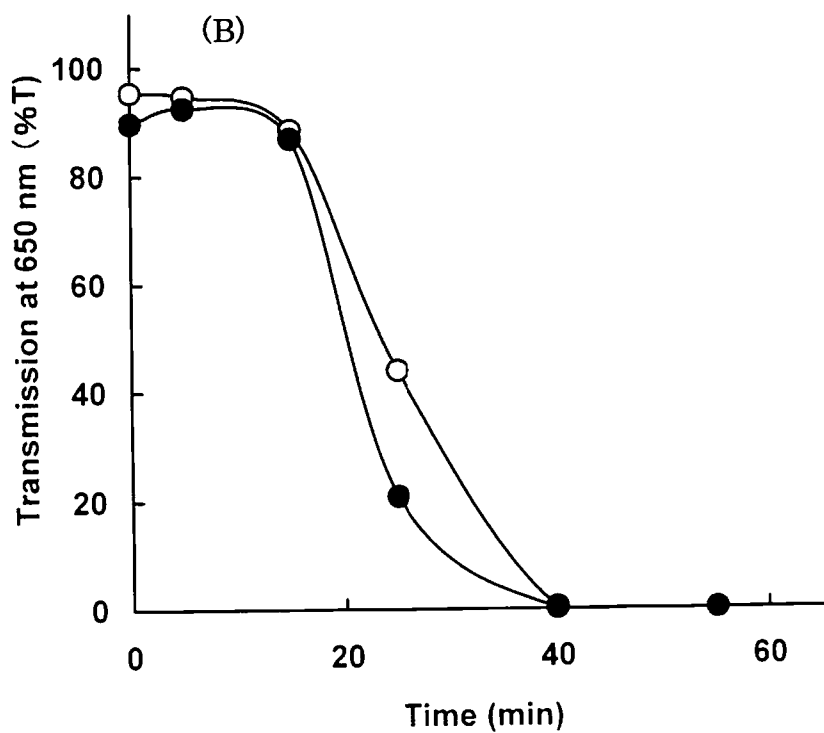
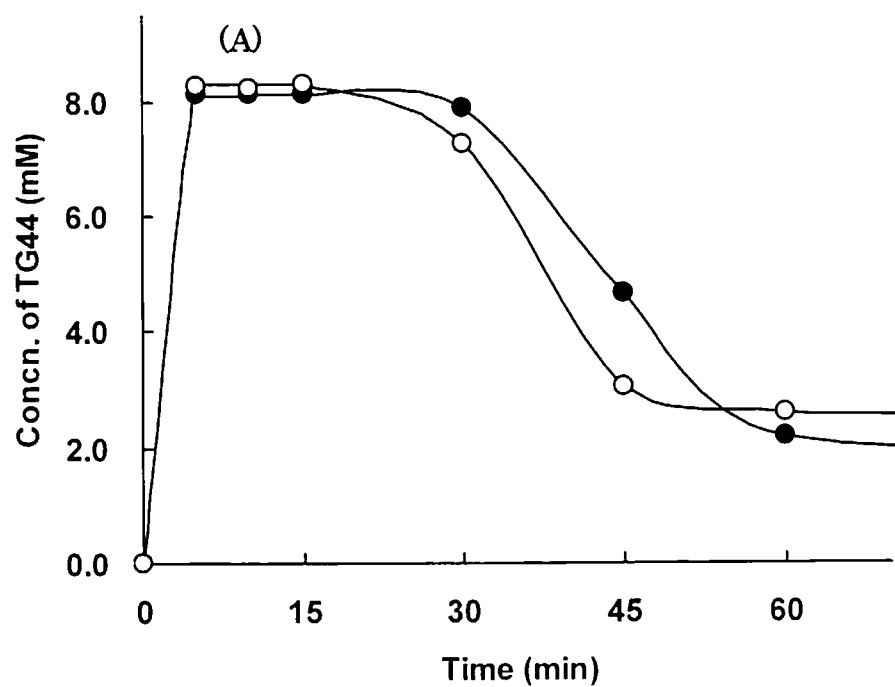


Fig. 27. Dissolution behavior (A) of TG44/ β -CyD complex prepared by the cogriding and spray-drying methods and transmission (650 nm) in solutions (B) after addition of the complex.
 ○; cogriding method, ●; spray-drying method.

2-3 非包接量の算出

ゲスト分子の含量は、一般に複合体を適当な溶媒に溶解後、UV、GLC、HPLCを用いて測定される。ゲスト分子が揮発性オイルの場合は蒸留物中のオイル量を測定する。一方、熱分析法ではゲスト分子が CyDs の熱分解点 (250・300℃) 前に熱変化する場合、その熱量測定により固体中の遊離ゲスト分子を定量する。^{47, 48)} 本節では TG44/ β -CyD 複合体中の非包接 TG44 量を算出するため、TG44 と β -CyD 粉碎物を種々の割合で混合し、それらの 184℃ における吸熱ピークの熱量を DSC 用いて測定した。Fig. 28 は種々の割合で混合した物理的混合物体中の非包接 TG44 量と 184℃ における熱量に関して標準となる検量線を示す。非包接 TG44 量と熱量は良好な直線性 ($r=0.9998$) を示し、本実験条件下において非包接 TG44 量の検出限界は 2% 未満であった。上記噴霧乾燥法ならびに混合粉碎法で調製した複合体を DSC 測定した結果、184℃ に吸熱ピークは観察されなかったことから、複合体中の非包接 TG44 量は検出限界以下 (2% 以下) であると考えられる。

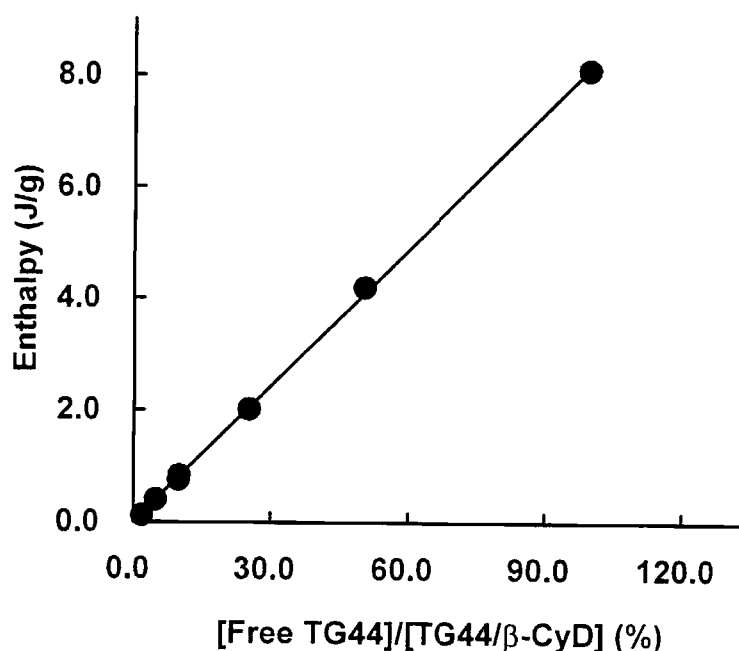


Fig. 28. Plot of fusion enthalpy (184 °C) of TG44 *versus* free TG44 content in TG44/ β -CyD mixture.

第 4 節 小括

本章では、ボールミル法および噴霧乾燥法により TG44/ β -CyD 複合体を調製するとともに、複合体中の遊離薬物を定量した。以下に得られた知見を要約する。

- 1) TG44 と β -CyD をボールミルで 10 時間混合粉碎して溶解性に優れる複合体を調製した。また、TG44 と β -CyD を 1 mM 塩酸中 90℃ に加温後、噴霧乾燥して複合体を調製した。両方法で調製した TG44/ β -CyD 複合体の水への溶解度は増大し、溶解速度および溶解性の指標とした溶液の可視光透過率も上昇した。
- 2) TG44/ β -CyD 複合体中の非包接 TG44 量を DSC により検討した結果、非包接含量とその熱量は良好な直線性 ($r=0.9998$) を示し、DSC 法による非包接 TG44 量の検出限界は 2% 未満であった。混合粉碎および噴霧乾燥法で調製した TG44/ β -CyD 複合体中の非包接 TG44 含量は検出限界以下 (2% 以下) であった。

溶媒を使用しない混合粉碎法は噴霧乾燥法に比べて操作が簡便であるため、以後の検討に用いた TG44/ β -CyD 固体複合体はボールミル法を用いて調製した。

第4章 TG44/ β -シクロデキストリン複合体の物理化学的性質

第 1 節 序

経口製剤が目的とする薬効を発揮するためには、その物理化学的性質を十分に把握し、物性に応じた製剤設計を行うことが重要である。特に、固体物性の相違は製剤からの薬物の溶出性やバイオアベイラビリティに影響を及ぼすとともに、有効で安全な医薬品を安定して供給するための品質管理を行う上でも重要である。そこで、本章では TG44/ β -CyD 複合体の医薬品への応用を企図して、前章で述べたボールミル法で調製した複合体の性状、溶解性、吸湿性および溶出性について検討した。

第 2 節 TG44/ β -CyD 複合体の物理化学的性質

2-1 性状

ボールミル法により調製した TG44/ β -CyD 複合体および TG44 の色、形状、においおよび味を調べた結果を Table 7 に示す。色は色彩色差計を用いて色相・明度・彩度を測定し、JIS Z 8102-1985 (物体色の色名) に従って色名を付記した。その結果、「本品は白色の粉末で、においはなく、味はわずかに苦い」と規定した。

Table 7. Description of TG44/ β -CyD complex and TG44.

Compound	Property				Attribute			
	Color	Form	Smell	Taste	Hue	Lightness	Saturation	Color name
Complex	White	Powder	Odorless	Slightly bitter	4.1 G	9.6	0.3	White
TG44	White	Crystal or crystalline powder	Odorless	Tasteless	—	—	—	—

一方、TG44 は、「白色の結晶又は結晶性の粉末で、においはなく、味はない」粉末であり、TG44/ β -CyD 複合体とは異なった。なお、TG44/ β -CyD 複合体および TG44 の形状は、Fig. 29 に示す顕微鏡写真を観察し、規定した。

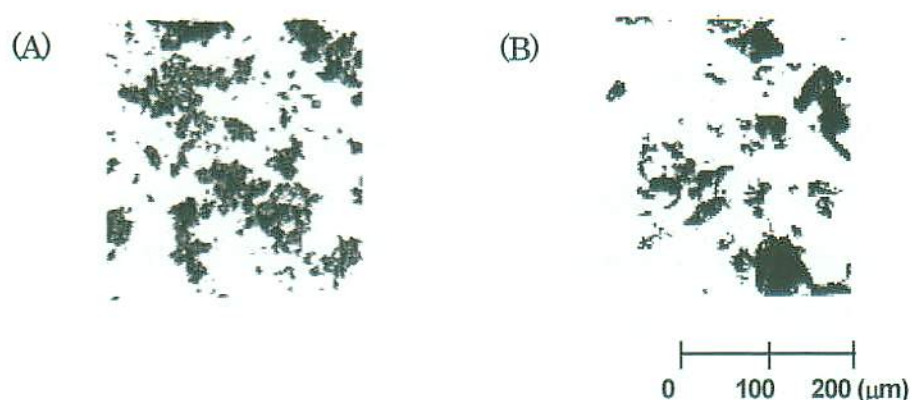


Fig. 29. Micrographs of TG44/ β -CyD complex and TG44.

(A) TG44/ β -CyD complex prepared by cogrinding method, (B) TG44.

固形製剤は、主薬の他に賦形剤をはじめ多くの成分を含む不均一系であるため、各成分の均一性、特に主薬の含量均一性の確保が重要となる。さらに、固形製剤の含量均一性は、粒度分布、密度、粒度別含量、流動性などの粉体特性に影響される。Table 8 は、ボールミル法および噴霧乾燥法により調製した TG44/ β -CyD 複合体のゆるみ嵩密度、タップ嵩密度を TG44 単独の場合と比較した結果を示す。さらに、それらの粒度分布をレーザー回折散乱法により測定した結果を Fig. 30 に示す。ボールミル法により調製した TG44/ β -CyD 複合体の密度は TG44 単独や噴霧乾燥法により調製した複合体粉体に比べて約 2 倍大きかった。また、ボールミル法により調製した TG44/ β -CyD 複合体の粒度は幅広く分布していたが、噴霧乾燥法で調製した複合体の粒度分布は比較的シャープであった。さらに、これらの平均粒子径は TG44 単独が 22 μm であるのに対して、ボールミル法で調製した複合体は約 9 μm 、噴霧乾燥法で調製した複合体は約 3 μm であり、複合体化により微細化されることが確かめられた。

Table 8. Loose and tap powder densities of TG44/ β -CyD complex and TG44 (g/mL).

Complex	Loose powder density	Tap powder density
Grinding method	0.40 - 0.43	0.72 - 0.74
Spray-drying method	0.18 - 0.20	0.38 - 0.40
TG44	0.15 - 0.20	0.33 - 0.39

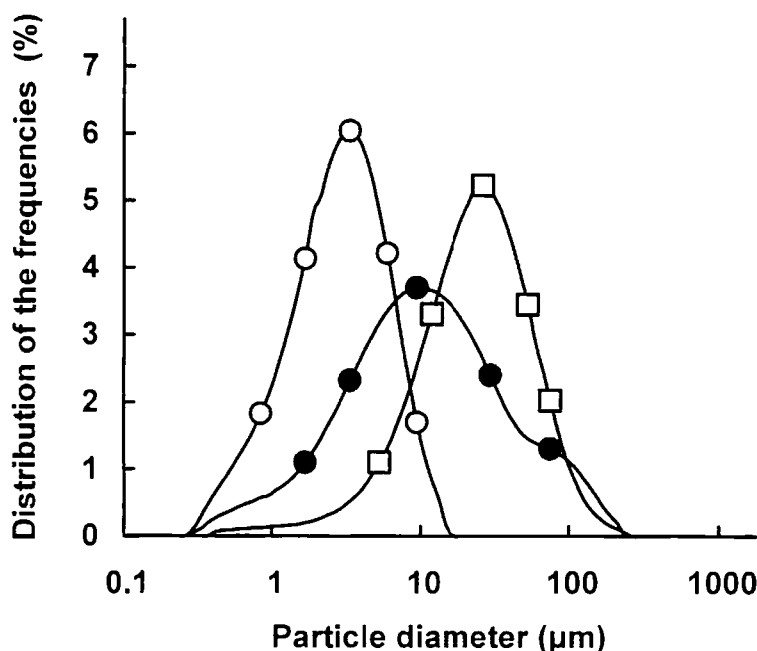


Fig. 30. Particle size distributions of TG44/ β -CyD complex and TG44, measured by laser light scattering method.

○, complex prepared by spray-drying method; ●, complex prepared by grinding method; □, TG44 alone.

2-2 溶解性

経口固形製剤が薬効を発揮するには、主薬が吸収部位の消化管液に溶解する必要がある。さらに、品質管理面においては、製剤中の主薬がどのような溶媒にどの程度溶けるかを把握することが規格および試験方法を設定するために要求される。Table 9 は TG44/ β -CyD 複合体の各種溶媒に対する溶解性を日局 XIV の通則に準じて測定した結果を示す。その結果、本品は、「*N,N*-ジメチルホルムアミド又はジメチルスルホキシド」に溶けやすく、水に溶けにくく、メタノールに極めて溶けにくく、アセトニトリル、エタノール (99.5)、1-オク

タノール又はジエチルエーテルにほとんど溶けない」と規定した。さらに、Table 10 は日局崩壊試験法第 1 液 (pH 1.2) および第 2 液 (pH 6.8) における溶解性を測定した結果、「第 1 液および第 2 液にほとんど溶けない」と規定した。なお、TG44/ β -CyD 複合体の調製方法による溶解性の差は認められなかった。一方、TG44 の各種溶媒に対する溶解性を比較し、Table 11 に示すように TG44 は、「ギ酸に溶けやすく、ジメチルスルホキシドに溶けにくく、メタノールに極めて溶けにくく、水、アセトニトリル、エタノール (95) 又はジエチルエーテルにほとんど溶けない」と規定した。TG44/ β -CyD 複合体の水に対する溶

Table 9. Solubilities of TG44/ β -CyD complex in various solvents at 20 °C.

Solvent	Solubility
<i>N,N</i> -Dimethyl formamide	500 mg/mL \leq < 1000 mg/mL
Dimethyl sulfoxide	250 mg/mL \leq < 1000 mg/mL
Water	1 mg/mL \leq < 5 mg/mL
Methyl alcohol	0.1 mg/mL \leq < 0.5 mg/mL
Acetonitrile	< 0.1 mg/mL
Ethyl alcohol (99.5)	< 0.1 mg/mL
1-Octyl alcohol	< 0.1 mg/mL
Diethyl ether	< 0.1 mg/mL

Table 10. Solubilities of TG44/ β -CyD complex in JP 1st and 2nd fluids at 20 °C.

Solvent	Solubility	Description term in JP XIV
1st fluid (pH 1.2)	< 0.1 mg/mL	Practically insoluble
2nd fluid (pH 6.8)	< 0.1 mg/mL	Practically insoluble

Table 11. Solubilities of TG44 in various solvents at 20 °C.

Solvent	Solubility
Formic acid	500 mg/mL \leq < 1000 mg/mL
Dimethyl sulfoxide	10 mg/mL \leq < 50 mg/mL
Methyl alcohol	0.1 mg/mL \leq < 0.5 mg/mL
Water	< 0.1 mg/mL
Acetonitrile	< 0.1 mg/mL
Ethyl alcohol (95)	< 0.1 mg/mL
Diethyl ether	< 0.1 mg/mL

解性は TG44 に比べて増大し、これは水溶液において包接複合体を形成することに起因するものと推定される。

2-3 吸湿性

製剤設計の段階において、吸湿が原因で様々な問題（例えば、安定性の劣化、外観の変化、結晶の転移、製造時における機械への付着、流動性の低下など）が発生することから、薬物の吸湿性について十分な検討が必要である。 Fig. 31 は、ボールミル法により調製した TG44/ β -CyD 複合体、TG44 および β -CyD を各種相対湿度 (RH 25%~75%、温度 25°C) で 7 日間放置し、それらの重量変化を経時的に測定した結果を示す。 TG44/ β -CyD 複合体および β -CyD の重量は吸湿により経時的に増加し、約 3 日で平衡に達した。 一方、TG44 は RH 75% 条件下でも重量増加が認められず、吸湿性を示さなかった。 上記の結果から、TG44/ β -CyD 複合体は 25°C、RH 75% で 7 日間放置したときの吸湿量が 3.0% 以上であり、「本品は吸湿性である」と規定した。⁴⁹⁾

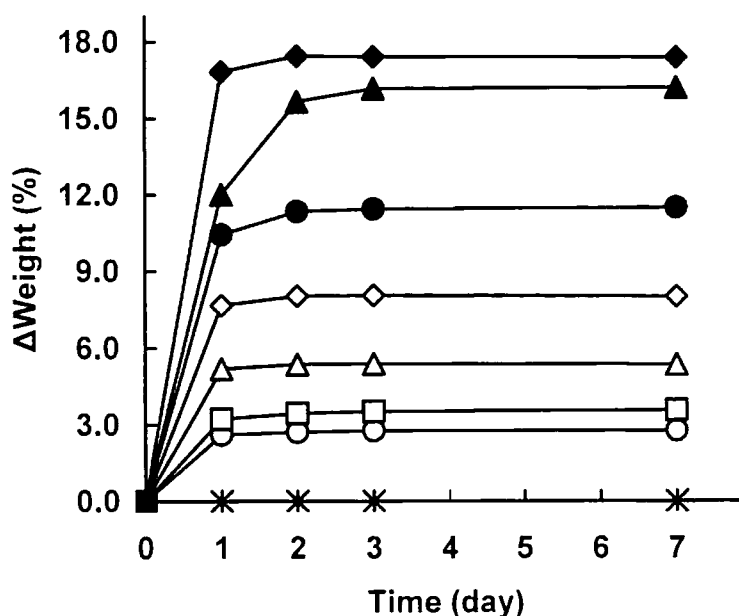


Fig. 31. Plots of weight change of TG44/ β -CyD complex, β -CyD and TG44 stored under different humidity conditions for 7 days at 25 °C.
 ○, complex at 25% RH; □, complex at 43% RH; △, complex at 57% RH; ◇, complex at 75% RH; ●, β -CyD at 25% RH; ▲, β -CyD at 57% RH; ◆, β -CyD at 75% RH; *, TG44 at 75% RH.

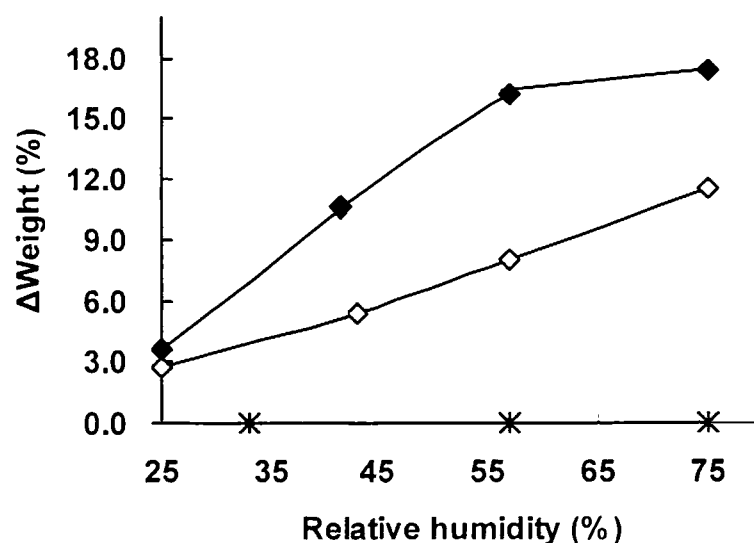


Fig. 32. Plots for hygroscopicities of TG44/β-CyD complex (◇), β-CyD (◆), and TG44 (*) stored under different relative humidities for 7 days at 25 °C.

2-4 溶出性

経口固形製剤は服用後、消化管内で分散し、薬物が溶解、吸収されて薬効を発揮する。難水溶性薬物や放出制御製剤の場合、薬物の溶解速度は吸収の律速段階となるため、その溶解性はバイオアベイラビリティや薬効に影響する重要な物理化学的特性である。

そこで、ボールミル法により調製した TG44/β-CyD 複合体の錠剤からの薬物溶出挙動をパドル法 (回転速度 50、100、200 rpm) を用いて検討した。Fig. 33(A) に示すように、複合体の溶出速度は TG44 に比べ著しく速く、回転数の増加につれて増大した。Fig. 33 (B) は、ボールミル法および噴霧乾燥法により調製した TG44/β-CyD 複合体粉末の溶出挙動を物理的混合物 (1:1) と比較した結果を示す。なお、粉末法³⁰⁾ はパドル高速回転 (900 rpm) で行った。両方法で調製した TG44/β-CyD 複合体は高回転速度下、速やかに溶解後過飽和 (約 8 mM) に達し、過飽和時の溶解度は物理的混合物の約 5 倍であった。この過飽和現象は 900 rpm の高速回転下で約 30 分間維持し、その後徐々に低下した。これは、複合体の解離に伴い、低溶解性の TG44 結晶の析出が高速パドル回転下で促進されたことによるものと考えられる。一方、200 rpm 以下の回転数では溶解度の低下は観察

されなかった。TG44 と β -CyD の物理的混合物の溶解速度は TG44 に比べて僅かに増大したが、複合体に比べて著しく低かった。TG44 は胃内 H.ピロリ菌と接触して抗菌活性を発揮するため、 β -CyD 複合体投与により高濃度の過飽和状態が長時間維持されることは TG44 の抗菌活性発現に際して有利であると考えられる。

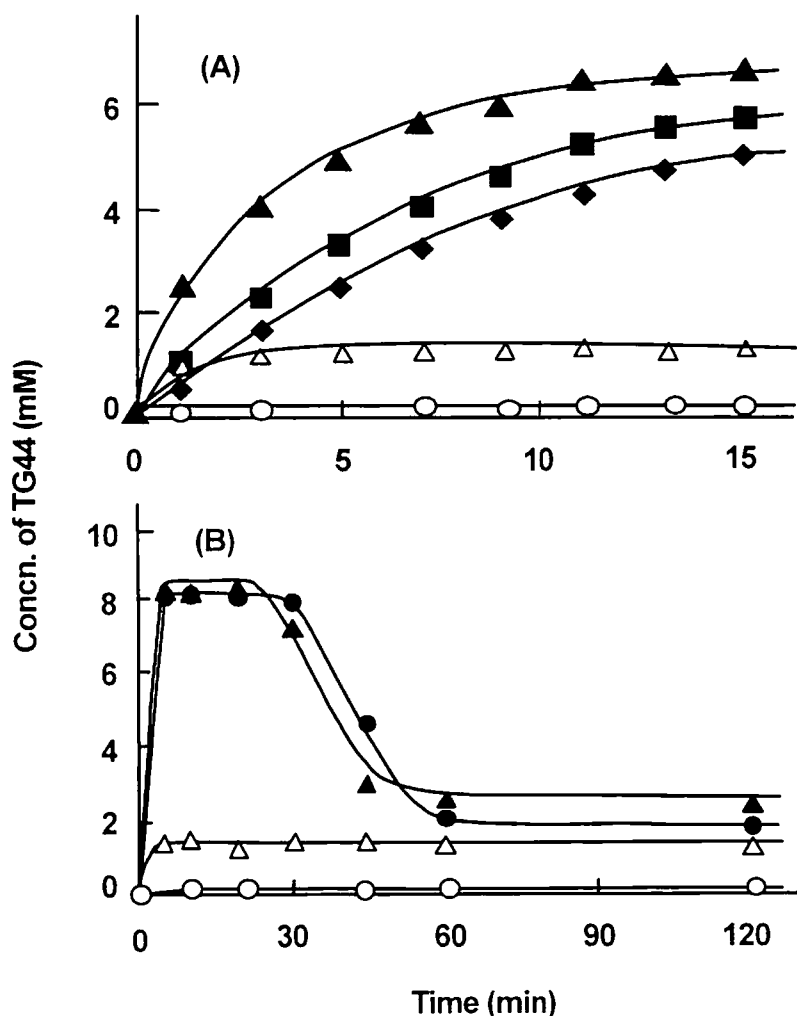


Fig. 33. (A) Dissolution profiles of ground TG44/ β -CyD complex (1.5 g, < 100 mesh) and their physical mixture with a 1:1 molar ratio in 100 ml water, measured by the paddle method at 50, 100 and 200 rpm at 25 °C. \blacklozenge , complex at 50 rpm; \blacksquare , complex at 100 rpm; \blacktriangle , complex at 200 rpm; \triangle , physical mixture of TG44 and β -CyD in a 1:1 molar ratio at 200 rpm; \circ , TG44 alone at 200 rpm. (B) Dissolution profiles of ground and spray-dried TG44/ β -CyD complexes (1.5 g, < 100 mesh) and their physical mixture with a 1:1 molar ratio, measured by the dispersed amount method at 900 rpm in water (100 ml) at 25 °C. \bullet , ground complex; \blacktriangle , spray-dried complex; \triangle , physical mixture of TG44 and β -CyD in a 1:1 molar ratio; \circ , TG44 alone.

第 3 節 小括

本章では、TG44/ β -CyD 複合体の物理化学的性質（性状、溶解性、吸湿性、溶出性など）について検討した。以下に得られた知見を要約する。

- 1) TG44/ β -CyD 複合体の性状および溶解性を規定した。25℃, 57%RH と 25℃, 75% RH で 7 日間保存による吸湿量はそれぞれ約 8.4% と約 12% であり、複合体は吸湿しやすい粉末であった。
- 2) TG44/ β -CyD 複合体錠剤からの薬物溶出挙動をパドル法で検討した結果、溶出速度は TG44 単独に比べて著しく大きく、回転数の増加につれて増大した。複合体の溶解挙動を粉末法で検討した結果、TG44 単独に比べて著しく増大し、高速パドル回転条件下 (900 rpm) においても薬物濃度は高い過飽和状態を約 30 分以上維持した。

以上の結果から、TG44/ β -CyD 複合体の溶解速度は TG44 単独に比べて著しく速く、高濃度の過飽和状態を長時間維持することが確かめられた。これらの結果は、TG44/ β -CyD 複合体は経口投与後、胃内 TG44 を長時間、高濃度に維持し、H.ピロリに対して高い *in vivo* 除菌効果を示すことを示唆するとともに、新規 H.ピロリ除菌剤の経口固形製剤としての開発に際して有用な情報を提供するものである。

第5章 TG44/ β -シクロデキストリン複合体の薬理活性

第1節 序

H.ピロリはヒトの胃粘膜に感染する細菌の一つであり、慢性胃炎および胃・十二指腸潰瘍の発生に関与すると考えられている。また、H.ピロリを除菌すると潰瘍の再発率が低下することから、現在 H.ピロリ除菌療法として、抗生剤とプロトンポンプ阻害剤との併用療法が世界で広く行われている。しかしながら、クラリスロマイシン (CAM)、メトロニダゾール (MNZ) やアモキシシリン (AMPC) 耐性菌が蔓延しつつあり、それらの除菌薬が望まれている。本研究で対象とした TG44 は後述 (本章第2節) するように、H.ピロリに対して高い *in vitro* 抗菌活性を示した。しかしながら、TG44 は極めて難水溶性であるため、経口剤への応用を企図するには水溶性の改善が必要であると考えられた。前章までの検討から、TG44 は β -CyD と非晶質性の固体複合体を形成し、TG44 の溶解速度は著しく増大するとともに、過飽和溶解状態を長時間維持することから *in vivo* 抗菌活性の増大が期待された。そこで、本章では TG44 の H.ピロリに対する *in vitro* 抗菌活性、さらにスナネズミ H.ピロリ感染モデルを用いて TG44 ならびに TG44/ β -CyD 複合体の *in vivo* 抗菌活性について検討した。

第2節 TG44 の *in vitro* 抗菌活性

TG44 の抗菌活性は日本化学療法学会標準法⁵¹⁾ の寒天平板希釈法に準じて、発育阻止濃度 (Minimum Inhibitory Concentration、MIC) を測定した。Table 12 は、TG44 の H.ピロリに対する MIC 測定結果を示す。通常用いられる 7% 馬脱繊維血液添加培地における MIC は 25 μ g/mL 以上であり抗菌活性を示さなかった。これは TG44 が二つのエステル基を有しており、血液添加培地中の血液に含まれるエステラーゼによる加水分解を受けるためと考えられる。H.ピロリは複雑な栄養要求性を示し、単純な無機塩培地では培養できない。通常、血液や血清を添加した培地で

培養するが、CyD 添加培地でも培養可能なことが R. Olivieri らにより報告されている。⁵²⁾ そこで、同様な手法を用いて、0.1% β -CyD 添加培地中における TG44 の MIC 値を測定した。その結果、TG44 はいずれの接種菌量 ($10^5 \sim 10^8$ CFU/mL) においても高い抗菌活性 ($0.20 \sim 0.39 \mu\text{g/mL}$) を示し、接種菌量による差異は認められなかった。なお、対照として用いた AMPC はいずれの培地においても同様の MIC 値 ($0.025 \mu\text{g/mL}$) を示した。以上の結果より、本系は適切な MIC 測定系であると判断し、以後の実験は 0.1% β -CyD 添加培地を用いることとした。

Table 12. Differences in susceptibilities of *H. pylori* to TG44 and AMPC in test media.

Test Medium	Substance	MIC ($\mu\text{g/mL}$)			
		<i>H. pylori</i> ATCC 43504			
		10^8 CFU/mL	10^7 CFU/mL	10^6 CFU/mL	10^5 CFU/mL
7% Defibrinated Horse Blood	TG44	>25	>25	>25	>25
	AMPC	0.05	0.025	0.025	0.025
0.1% β -Cyclodextrin	TG44	0.39	0.20	0.20	0.20
	AMPC	0.025	0.025	0.025	0.025

Incubation: 37°C , 3 days under microaerobic conditions.

Medium: Brain heart infusion agar (Difco).

Method: Agar dilution (Streak).

Concentration stepwise of TG44: TG44 was dissolved in dimethylsulfoxide ($10000 \mu\text{g/mL}$), and serial dilutions were prepared in sterile water.

Table 13 は種々の *H.ピロリ* 菌株に対する TG44 の *in vitro* 抗菌活性、ならびに現在除菌療法に汎用されている AMPC、CAM や MNZ の 3 種の抗生剤と比較検討した結果を示す。*H.ピロリ* 菌株は、標準株として ATCC 43504、ATCC 43629 の 2 株に加え、臨床分離株 12 株を用いて MIC を測定した。臨床分離株のうち、TK

1047 および TK1147 の 2 株は CAM 耐性株であり、TK 1003 株は MNZ 耐性株であった。また、標準株の ATCC 43504 は MNZ 耐性株であることを確認した。TG44 は CAM および MNZ 耐性臨床分離株に対して、標準株と同様の MIC 値を示した。さらに、TG44、AMPC、CAM、MNZ について H.ピロリ菌の 6 種の多

Table 13. Antibacterial spectra of TG44, AMPC, CAM and MNZ.

Inoculum size: 10^7 CFU/mL

Strain	MIC (μ g/mL)			
	TG44	AMPC	CAM	MNZ
<i>H. pylori</i> ATCC 43504	0.50	0.0313	0.0156	64
<i>H. pylori</i> ATCC 43629	0.50	0.0313	0.0313	2
<hr/>				
Clinical Isolate				
<i>H. pylori</i> TK 1025	0.25	0.0313	0.0313	16
<i>H. pylori</i> TK 1027	0.125	0.0313	0.0313	8
<i>H. pylori</i> TK 1030	0.5	0.0156	0.0313	8
<i>H. pylori</i> TK 1042	0.5	0.125	0.0625	8
<i>H. pylori</i> TK 1126	0.25	0.0313	0.0313	8
CAM-resistant Clinical Isolate				
<i>H. pylori</i> TK 1047	0.125	0.0156	2	4
<i>H. pylori</i> TK 1147	0.25	0.0313	4	4
MNZ-resistant Clinical Isolate				
<i>H. pylori</i> TK 1003	1	0.0313	0.0625	64

Incubation: 35°C, 3 days under microaerobic conditions.

Medium: Brain heart infusion agar (Difco) with 0.1% β -CyD.

Method: Agar dilution (Streak).

剤耐性臨床分離株に対しても同様に MIC を測定した (Table 14)。その結果、TG44 は AMPC、CAM、MNZ 多剤耐性臨床分離株に対しても、標準株と同等の MIC 値を示した。以上の結果より、TG44 はいずれの臨床分離株に対しても高い MIC 値を示し、臨床で問題となっている多剤耐性 H.ピロリに対して有効な除菌剤となり得る可能性が示唆された。

Table 14. Antibacterial activities of TG44, AMPC, CAM and MNZ against *H. pylori*.

Inoculum size: 10^7 CFU/mL

Organism	MIC ($\mu\text{g/mL}$)			
	TG44	AMPC	CAM	MNZ
Standard strains				
<i>Helicobacter pylori</i> ATCC 43504	0.5	0.0313	0.0156	64
<i>Helicobacter pylori</i> ATCC 43629	0.5	0.0313	0.0313	2
Clinical isolates				
<i>Helicobacter pylori</i> No. 1	1	8	8	4
<i>Helicobacter pylori</i> No. 2	0.5	4	8	4
<i>Helicobacter pylori</i> No. 3	0.25	0.25	4	4
<i>Helicobacter pylori</i> No. 4	0.5	0.0313	1	32
<i>Helicobacter pylori</i> No. 5	0.5	0.5	2	64
<i>Helicobacter pylori</i> No. 6	0.5	0.5	4	64

Incubation: 35°C, 3 days under microaerobic conditions.

Medium: Brain heart infusion agar (Difco) with 0.1% β -CyD.

Method: Agar dilution (Streak).

次に、*H.ピロリ*に対する特異性を確認するため、各種グラム陽性及びグラム陰性菌株に対する MIC を *H.ピロリ*と同様、AMPC、CAM、MNZ を対照薬剤に用いて測定した (Table 15)。TG44 は、調製可能な最大濃度である 25 $\mu\text{g/mL}$ においても検討したすべての菌株に抗菌活性を示さず、*H.ピロリ*に対する高い選択性が確認された。一方、AMPC と CAM は広い抗菌スペクトルを示し、元来抗原虫薬である MNZ は *B. subtilis* に対する MIC 値は 200 $\mu\text{g/mL}$ であったが、いずれの菌株に対しても抗菌活性を示さなかった ($> 200 \mu\text{g/mL}$)。

Table 15. Antibacterial spectra of TG44, AMPC, CAM and MNZ against various organisms.

Inoculum size: 10⁶ CFU/mL

Organism	MIC (µg/mL)			
	TG44	AMPC	CAM	MNZ
Gram(+)				
<i>Staphylococcus aureus</i> 209P JC	>25	0.20	0.10	>200
<i>Staphylococcus aureus</i> Smith	>25	0.20	0.20	>200
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	>25	0.78	0.20	>200
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	>25	0.78	1.56	>200
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	>25	0.05	0.10	200
Gram(-)				
<i>Escherichia coli</i> K-12	>25	3.13	6.25	>200
<i>Klebsiella pneumoniae</i> NCTC 9632	>25	50	12.5	>200
<i>Serratia marcescens</i> IFO 3736	>25	100	>100	>200
<i>Proteus vulgaris</i> OX-19	>25	>100	>100	>200
<i>Proteus mirabilis</i> 1287	>25	0.39	>100	>200
<i>Morganella morganii</i> KONO	>25	>100	>100	>200
<i>Providencia rettgeri</i> NIH 96	>25	3.13	>100	>200
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO-1	>25	>100	>100	>200
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> NCTC 7844	>25	>100	25	---

Medium: Mueller-Hinton S (Eiken).

Method: Agar dilution (Spot).

第 3 節 TG44 および TG44/ β -CyD 複合体の *in vivo* 除菌効果

1. スナネズミ感染実験モデル

TG44 の *in vivo* における除菌効果を検証するため、平山らの方法⁵³⁾ に準じてスナネズミに *H.ピロリ* 菌を接種し、胃への定着率を検討した。 Fig. 34 は、スナネズミに *H.ピロリ* を経口投与した際の胃内生菌数の推移を求めた結果を示す。 菌接種後 14 日目で胃内生菌数が約 10^5 個/胃となり、胃への定着が確認された。 そこで、菌接種後 14 日目に薬剤を投与することにした。

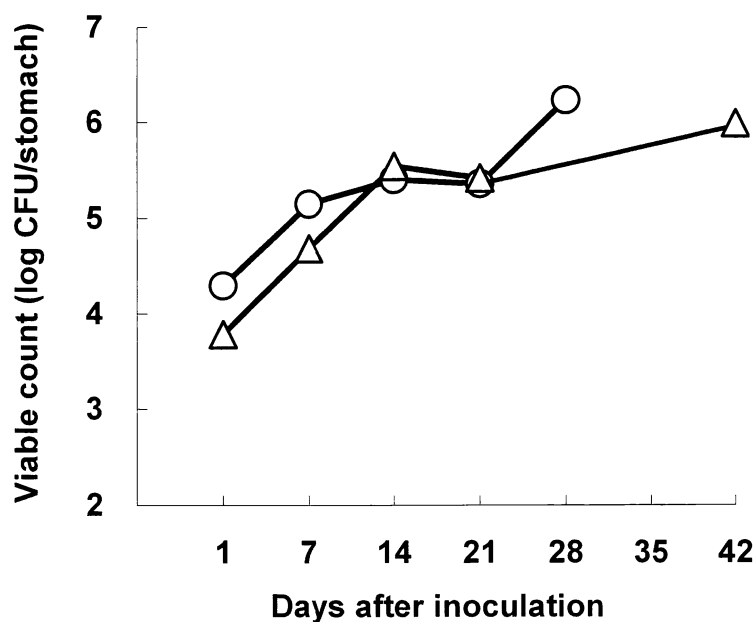


Fig. 34. Changes of the viable Counts in gastric mucosa of mongolian gerbils after *H. pylori* inoculation. The measurements were duplicated (n=2). The circle(○) and the triangle(△) mean runs 1 and 2, respectively. Values are expressed as mean \pm S.D. (n=3).

2. TG44 および TG44/ β -CyD の効果

H.ピロリ 感染スナネズミモデルに TG44、TG44/ β -CyD 複合体、コントロールとして β -CyD を経口投与し、それらの胃内生菌数と除菌率を検討した結果を Fig. 35 に

示す。 TG44 単独 (300 mg/kg)、 β -CyD (638 mg/kg) はコントロールに対して有意な生菌数の減少は観察されず、完全な除菌はできなかった。 一方、TG44/ β -CyD 複合体を 938 mg/kg (TG44 として 300mg/kg) 投与した場合は 5 例中すべてで完全な除菌が観察された。 この結果は、前述の TG44 の *in vitro* 抗菌活性の効果と異なるものであり、前述の *in vitro* 抗菌活性測定実験では TG44 は難水溶性であるため胃内において完全除菌に必要な溶解濃度に到達していなかったものと推察される。 一方、ここに示した TG44/ β -CyD 複合体の結果は、前章 (第 1. 3. 4 章) の検討から予想されるように、 β -CyD との複合体形成により TG44 の水への溶解性が改善され、H.ピロリ感染スナネズミ *in vivo* 実験系において除菌効果が得られたものと推察される。

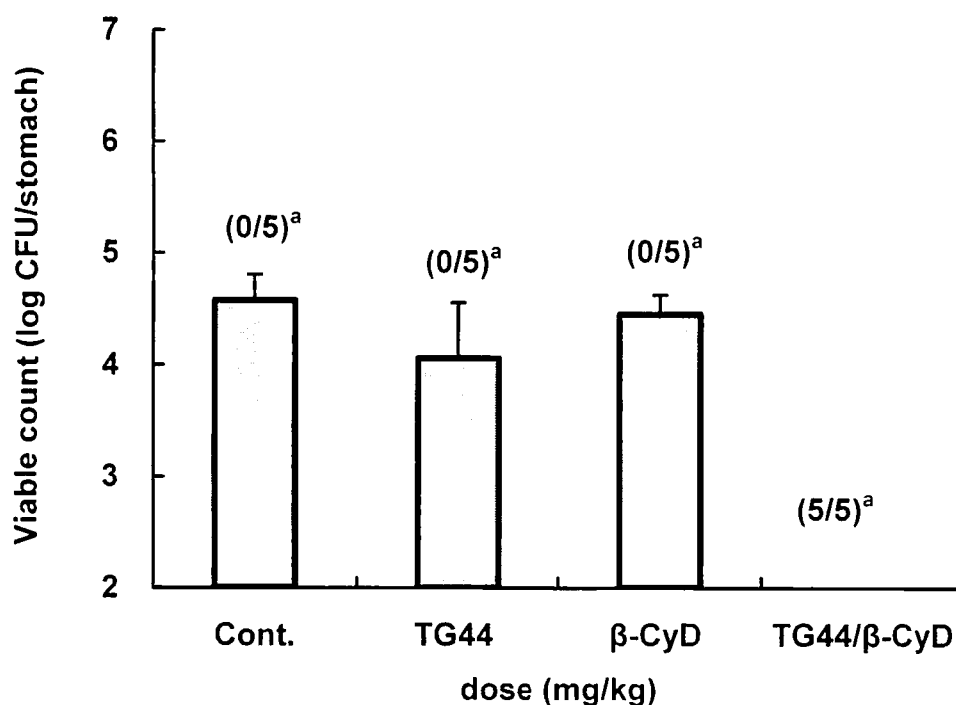


Fig. 35. Viable cell counts in stomachs of *H. pylori* infected gerbils after treatments with TG44 (300mg/kg), β -CyD (638mg/kg) and TG44/ β -CyD complex (938mg/kg). Drugs were administered orally to fasted animals three times a day (t.i.d.) 2 weeks after inoculation with *H. pylori*. Viable cell counts were determined next day after the final administration. Values are expressed as mean \pm S.D.(n=5).

^a No. of *H. pylori* negative / No. of animal tested

Fig. 36 は、TG44/ β -CyD 複合体を経口投与 (500 ~ 1000 mg/kg) した際の *H.ピロリ* 感染スナネズミ *in vivo* 実験系における胃内生菌数と除菌率を示す。 下図から明らかなように、TG44/ β -CyD 複合体は用量依存的な胃内生菌数の減少と除菌率を示し、1000 mg/kg で完全除菌が観察された。 これらの結果は臨床応用が可能なことを示唆する。

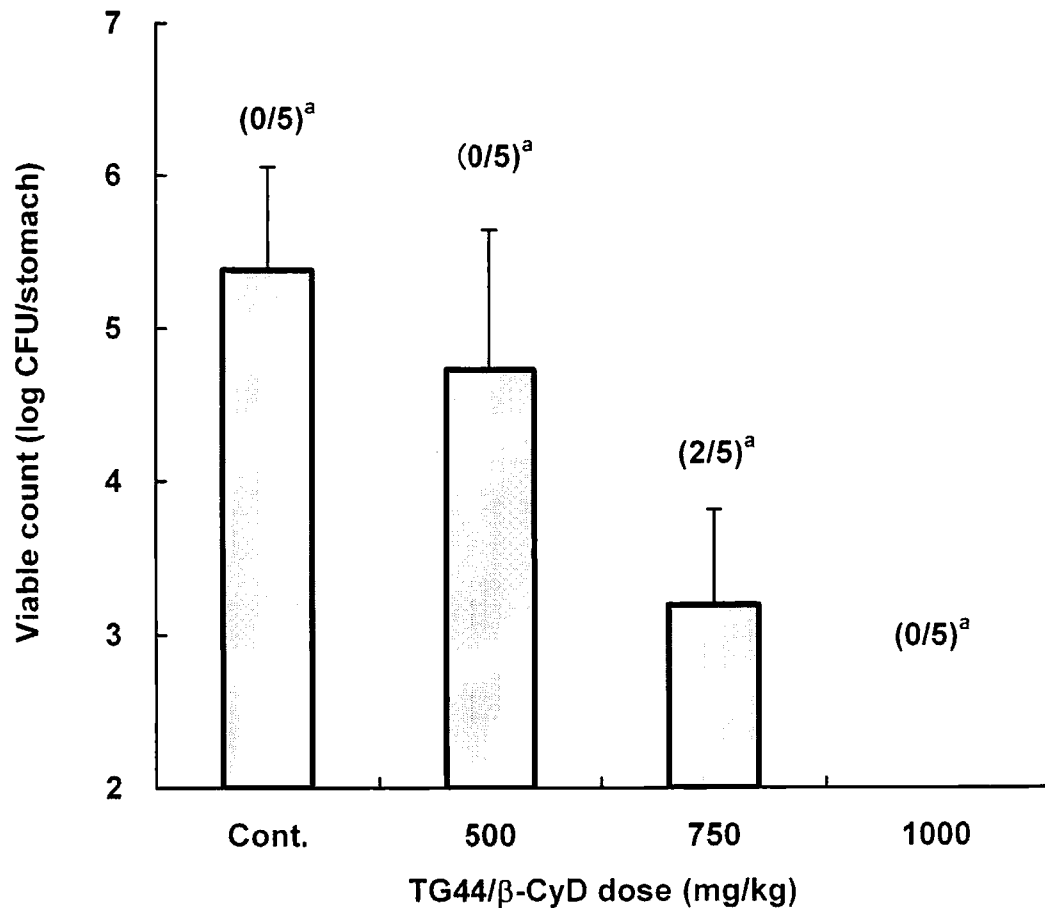


Fig. 36. Viable cell counts in stomachs of *H. pylori* infected gerbils after treatments with TG44/ β -CyD complex. Drug was administered orally to fasted animals three times a day (t.i.d.) 2 weeks after inoculation with *H. pylori*. Viable cell counts were determined next day after the final administration. Values are expressed as mean \pm S.D.(n=5).

^a No. of *H. pylori* negative / No. of animal tested

第 4 節 小括

本章では、H.ピロリに対する TG44 の *in vitro* 抗菌活性および H.ピロリ感染スナネズミモデルを用いて TG44、TG44/ β -CyD 複合体の *in vivo* 抗菌活性を検討した。以下に主な知見を要約する。

- 1) TG44 は、AMPC、CAM および MNZ 多剤耐性臨床分離株に対して標準株と同様の MIC 値 (0.1 ~ 1 μ g/mL) を示し、臨床で問題となっている多剤耐性 H.ピロリに対して有効な除菌剤となり得ることが示唆された。さらに、TG44 は各種一般細菌に対して調製可能な最大濃度である 25 μ g/mL においても抗菌活性を示さず、H.ピロリに対する高い選択性が確認された。
- 2) H.ピロリ感染スナネズミモデルを用いて除菌効果を検討した結果、TG44 単独投与では完全除菌できなかったが、TG44/ β -CyD 複合体を 938 mg/kg (TG44 として 300 mg/kg) 経口投与した場合、5 例中全てで完全除菌が観察された。また、除菌効果に用量依存性 (500 ~ 1000 mg/kg) がみられた。

以上の知見より、前章 (第 1. 3. 4 章) の検討から予想されたように、TG44 は β -CyD との複合体形成により水への溶解性や過飽和の持続などが改善され、その結果 *in vivo* 抗菌活性が増大したものと推察された。現在、これらの結果をもとに製剤処方され臨床試験を実施中である。

総 括

4-Methylbenzyl 4'-[*trans*-4-(guanidiomethyl) cyclohexylcarbonyloxy] biphenyl-4-carboxylate monohydrochloride (TG44) は H.ピロリ菌に対して高い選択毒性を有するビフェニル誘導体である。本研究では、TG44 の経口製剤へ応用を企図して、 β -シクロデキストリン (β -CyD) との包接複合体形成による製剤特性および抗菌活性の向上、ならびに固体複合体の予備的処方設計に関する基礎的検討を行った。まず、水溶液中における TG44 と β -CyD との相互作用を溶解度法、各種スペクトル法を用いて検討し、複合体の安定度定数、ゲスト・ホストの化学量論、包接様式などを明らかにした。次に、固体状態における TG44 と β -CyD との相互作用を粉末 X 線回折法、熱分析法および ^{13}C 固体 NMR スペクトル法を用いて検討し、ゲスト・ホストの化学量論と包接様式を推定するとともに、非晶質性複合体の構造解析における固体 NMR スペクトルの有用性を明らかにした。さらに、TG44/ β -CyD 固体複合体の調製法を確立し、得られた複合体の各種物性を調べた。TG44/ β -CyD 複合体の *in vitro* 抗菌活性および H.ピロリ感染スナネズミモデルを用いた *in vivo* 除菌活性を検討し、H.ピロリ除菌治療における TG44/ β -CyD 複合体の有用性を明らかにした。以下に本研究で得られた知見を総括する。

- 1) TG44 の溶解度は β -CyD 添加により直線的に増大し、 β -CyD 高濃度で複合体が析出する Bs 型相図を示した。TG44 の低い溶解度 (0.036 mM、25℃) は β -CyD 8 mM あるいは 15 mM 添加においてそれぞれ約 70 倍および約 40 倍増大した。UV およびケイ光スペクトルの検討から TG44 は β -CyD とモル比 1:1 複合体を形成すること、また ^1H -NMR ならびに ROESY スペクトルから水溶液中において β -CyD は TG44 のビフェニル基部分を優位に包接することが示唆された。
- 2) TG44/ β -CyD 固体複合体の粉末 X 線回折図および示差熱分析曲線において、TG44 由来の回折ピークならびに融解に基づく吸熱ピークは消失し、MASS スペクトルでは複合体の分子量に相当する m/z 1634 にピークが観察された。また、Giordano

プロットは TG44 と β -CyD とのモル比 1:1 複合体形成を支持した。

- 3) ^{13}C 固体 NMR スペクトルにおける ^{13}C シグナルに対する温度の影響 (80°C) を検討した結果、TG44 のビフェニル基炭素は温度の影響を受けにくかったが、シクロヘキシル基 (C6)、メチレン炭素 (C17)、トリル基炭素 (C22) は温度上昇に伴い先鋭化した。TG44 の芳香族部分 (主にビフェニル部分) と β -CyD 炭素の $T_{1\rho\text{H}}$ 値はいずれも約 4 ms の同じ値を与えることから両者は空間的に接近していることが示唆された。種々のコンタクト時間 ($60\ \mu\text{s} \sim 1500\ \mu\text{s}$) で 2D $^{13}\text{C}\text{-}^1\text{H}$ HETCOR スペクトルを測定した結果、固体状態において TG44 のビフェニル基部分が β -CyD 空洞に包接されることが示唆され、水溶液中における ^1H NMR スペクトルから推定した構造を支持した。
- 4) TG44 と β -CyD をボールミルで 10 時間混合粉碎して溶解性に優れる複合体を調製した。また、TG44 と β -CyD を 1 mM 塩酸中 90°C に加温後、噴霧乾燥して複合体を調製した。両方法で調製した TG44/ β -CyD 複合体の水への溶解度は増大し、溶解速度および溶解性の指標とした溶液の可視光透過率も上昇した。
- 5) TG44/ β -CyD 複合体中の非包接 TG44 量を DSC により検討した結果、非包接含量とその熱量は良好な直線性 ($r=0.9998$) を示し、DSC 法による非包接 TG44 量の検出限界は 2% 未満であった。混合粉碎および噴霧乾燥法で調製した TG44/ β -CyD 複合体中の非包接 TG44 含量は検出限界以下 (2% 以下) であった。
- 6) TG44/ β -CyD 複合体は水溶性で吸湿しやすい白色粉末であった。TG44/ β -CyD 複合体錠剤からの薬物溶出挙動をパドル法で検討した結果、溶出速度は TG44 単独に比べて著しく大きく、回転数の増加につれて増大するとともに高速パドル回転条件下 (900 rpm) においても薬物濃度は高い過飽和状態を約 30 分以上維持した。
- 7) H.ピロリに対する TG44 の *in vitro* 抗菌活性を検討した結果、AMPC、CAM および MNZ 多剤耐性臨床分離株に対して標準株と同様の MIC 値 ($0.1 \sim 1\ \mu\text{g/mL}$) を示し、多剤耐性 H.ピロリに対して有効な除菌剤となり得ることが示唆さ

れた。一方、TG44 は各種一般細菌に対しては抗菌活性を示さず、H.ピロリに対する高い選択性が確認された。H.ピロリ感染スナネズミモデルを用いて除菌効果を検討した結果、TG44 単独投与では完全除菌できなかったが、TG44/ β -CyD 複合体の場合、完全除菌が観察され除菌効果に用量依存性がみられた。

以上述べたように、TG44 は水溶液および固体状態において β -CyD と 1:1 包接複合体を形成し、包接部位は TG44 のビフェニル基部分であることが確認された。さらに、TG44 の水に対する溶解性などの製剤特性は β -CyD により改善され、その包接複合体は新規 H.ピロリ除菌薬として経口剤への応用の可能性を示唆した。本研究で得られた知見は、臨床開発を進める上で有用な基礎資料となっている。

謝 辞

本研究を行うに際して終始懇篤なる御指導と御鞭撻を賜りました熊本大学薬学部製剤設計学研究室 上釜兼人教授に深甚なる感謝の意を表します。

本研究を行うに際して有益な御指導と御協力を賜りました熊本大学薬学部製剤設計学研究室 平山文俊助教授、有馬英俊助教授に深く感謝の意を表します。

本論文作成に当たり有益な御助言と御校閲を賜りました熊本大学薬学部 今井輝子教授並びに矢原正治助教授に深く感謝の意を表します。

本研究を行うに際して有益な御指導と御協力を賜りました杏林大学医学部感染症学講座 神谷 茂教授並びに京都薬科大学 西野武志学長に深く感謝の意を表します。

本研究を行うに際して有益な御指導と御協力を賜りました熊本大学薬学部製剤設計学研究室の諸氏に深く感謝いたします

本研究を行うに際して有益な御指導と御協力を賜りましたナガセケムテックス株式会社 富永幸雄取締役、柳 利治課長、加守田 修課長、溝口潤一チームリーダーに深く感謝いたします。

常に有益な議論と御協力を頂きましたナガセケムテックス株式会社製品開発第2課 第1チーム 杉谷知慈研究員、守屋成真研究員、児玉和也博士、山岡英徳研究員、同第2チーム 小寺早苗研究員、高光三郎研究員並びに同生産技術第3課 加藤哲也研究員をはじめとするナガセケムテックス株式会社生化学品事業部の研究員の皆様に深く感謝いたします。

固体 NMR 測定に際して御鞭撻と御協力を頂きましたブルカー・バイオスピン株式会社 田村友美所長並びに甲野裕之博士に深く感謝いたします。

最後に、著者を励まし支えてくれた両親に深く感謝すると共に、本研究を行うにあたり協力を惜しまず常に支えてくれた妻 恵都子並びに家族に心から感謝いたします。

実験の部

1. 試料および溶媒

β -CyD は日本食品化工 (株) 製のものを使用した。TG44 はナガセケムテックス (株) の特許記載の方法に従い合成した。⁵⁴⁾ *N,N*-ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、ギ酸、エタノール (99.5%)、メタノール、アセトニトリル、1-オクチルアルコール、ジエチルエーテル、濃塩酸 (35%) および水 (HPLC Grade) はナカライテクス (株) 製のものを使用した。NMR 用の重水 (D_2O , 99.9%) および重ジメチルスルホキシド ($DMSO-d_6$, 99.9%) は ISOTEC Inc. 製のものを使用し、重塩酸 (DCl , NMR Grade)、重アセトン ($Acetone-d_6$, NMR Grade)、テトラメチルシラン (TMS, NMR Grade) および重 3-(トリメチルシリル)-1-プロピオン酸 ナトリウム塩 (TSP, NMR Grade) は和光純薬 (株) 製のものを使用した。IR 用の臭化カリウム (KBr, IR Grade) はナカライテクス (株) 製のものを使用した。ブレインハートインフュージョン寒天培地、ブレインハートインフュージョンは Difco 社製、ブルセラ培地は BBL 社製のものを使用した。アモキシシリン、クラリスロマイシン、メトロニダゾールは和光純薬 (株) 製、バンコマイシン、ポリミキシン、トリメトプリム、アンホテリシン B は SIGMA 社製、アネロバック・キャンピロは三菱ガス化学 (株) 製のものを使用した。塩化 2,3,5-トリフェニルテトラゾリウム、ウシ胎児血清は和光純薬 (株) 製、馬脱繊維血液は日本バイオテスト (株) 製のものを使用した。その他の試薬ならびに溶媒類はすべて市販特級品を使用した。

2. CyD 複合体の調製

混合粉碎法： 中央化工機 (株) 製 MB-1 型機を使用し、一定モル比の TG44 および β -CyD をジルコニア製ボール (充填率 60%、直径 25 ϕ) およびボットを用いて 10 時間混合粉碎し、複合体粉末を調製した。

噴霧乾燥法： 大川原化工機 (株) 製 L-8 型機を使用し、一定モル比の TG44 および β -CyD (β -CyD は水分換算を行った) を 1 mM 塩酸水に 90°C で溶解後、噴霧乾燥

して複合体を調製した。噴霧には二流体ノズルを使用した。

錠剤の調製： あらかじめ篩過 (< 100 メッシュ) した TG44 (0.48 g) と β -CyD (1.02 g) をスクリー管に秤量し、振り混ぜて混合した後、パーキンエルマー (株) 製の錠剤成型器を用いて直径 7 mm の錠剤に成型した。

3. 各種スペクトルの測定

NMR スペクトル： ^1H および ^{13}C -NMR スペクトルは、ブルカー・バイオスピン (株) 製 AVANCE-400 型 (^1H -NMR 外部磁場 400 MHz、 ^{13}C -NMR 外部磁場 100 MHz) を用いて測定した。溶媒は D_2O および DMSO-d_6 を用い、内部標準にトリメチルシラン、外部標準に重 3-(トリメチルシリル)-1-プロピオン酸ナトリウム塩を使用した。

ROESY スペクトル： 以下の条件下で -400 ~ 4000 Hz の範囲を 32 回スキャンした。Acquisition time, 0.171 s; relaxation delay, 2.0 s; spin-lock mixing time, 225 ms。

固体 ^{13}C NMR スペクトル： 固体 ^{13}C NMR スペクトルは、試料量約 80 μL をジルコニア製の試料管に詰め、ブルカー・バイオスピン (株) 製 AV300 WB 核磁気共鳴装置を用いて CP/MAS 法により測定した。温度可変測定 (25 ~ 80°C) には XYZ グラジェントプローブを用い、一定温度で約 20 分保温した後に積算を開始した。測定条件は以下の通りである。回転数: 13000 kHz、コンタクト時間: 1.0 ms、遅延時間: 4 s、積算回数: 5000 回、外部標準: L-アラニン、D-グリシン。

$T_{1\rho}\text{H}$ 測定： $T_{1\rho}\text{H}$ は、試料量約 80 μL をジルコニア製の試料管に詰め、ブルカー・バイオスピン (株) 製 AV300 WB 核磁気共鳴装置を用いて種々のスピンロック時間で測定した。スピンロック時間: 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 ms、コンタクト時間: 1 ms。

HETCOR スペクトル： HETCOR スペクトルは、試料量約 25 μL をジルコニア製の試料管に詰め、ブルカー・バイオスピン (株) 製 AV300 WB 核磁気共鳴装置を用いて、以下の条件で測定した。回転数: 13000 kHz、 ^1H マジックアングル (54.7°) パルス幅: 1.8 μs 、混合時間: 60 ~ 1500 μs 、遅延時間: 4 s、積算回数: 512 回、外部標準: L-アラニン、D-グリシン。

UV スペクトル： UV スペクトルは島津製作所（株）製紫外可視分光光度計 UV-2500PC を用い、0.022 ~ 0.05 mM TG44 および各種濃度の β -CyD 水溶液を 210 ~ 340 nm の波長範囲で測定した。透過率の測定は、TG44 と一定量の β -CyD の物理的混合物および TG44/ β -CyD 複合体（TG44 として 47.1 mg 相当量）を水 10 mL を加えてタッチミキサー（ヤマト科学, MT-31）で 3 分間振とう後、650 nm の波長で行った。

CD スペクトル： CD スペクトルは、日本分光（株）製円二色性分散計 J-720 を用い、0.052 mM TG44 および 0.052 mM β -CyD 水溶液を積算回数 4 回で測定した。

蛍光スペクトル： 蛍光スペクトルは、島津製作所（株）製 RF-5300PC を用い、0.0052 ~ 0.05 mM TG44 および 0.05 ~ 0.5 mM β -CyD 水溶液を 370 nm の励起波長で測定した。

IR スペクトル： IR スペクトルはパーキンエルマー（株）製 1650 FT-IR を用いて測定した。測定は、あらかじめ粉碎しておいた臭化カリウム（無水）（100 mg）と TG44（1 mg）あるいは TG44/ β -CyD 複合体（2 mg）をスクリー管に秤量し、振り混ぜて混合した後、成形した錠剤を用いて行った。

MASS スペクトル： マススペクトルはジオール社製 JMS-DX303 FAB マススペクトロメーターを用い、イオン化は正イオンモードで測定した。マトリックスはグリセリンを用い、TG44 および TG44/ β -CyD 複合体の濃度はいずれも 10 mM である。

4. 製剤物性の測定

粉末 X 線回折： 粉末 X 線回折測定は、理学電機（株）製 RINT-2000 型を使用し、加速電圧 40 kV、管球電流 15 mA、走査速度 2 °/min の条件で行った。

熱分析： 示差走査熱量測定は、理学電気（株）製 Thermo Plus 2 DSC8230 型およびセイコー電子工業（株）製 SSC5200H 熱分析システム TG/DTA220 型を用いて、試料（5 mg）を昇温速度 5 °C/min で行った。熱分析のキャリブレーションはインジウム（純度 99.999%、融点 156.2°C、熱量 (ΔH 28.99 J/g、昇温 20 °C/min)) で行った。

HPLC： 島津製作所製 HPLC system Class LC-10 を用いて測定した。溶解度法の実験の場合、TG44 0.3 g を 100 mL のビーカーに入れ、種々濃度の β -CyD 水溶

液 50 mL を加えた後、25℃ の恒温下で回転子（毎分 900 回転）を用いて 1 日攪拌した。試料溶液 約 4 mL をメンブランフィルター（セルロースアセテート、0.20 μm ）でろ過後、ろ液 1～3 mL を正確に採取し、水／アセトニトリル混液（1:1）を加えて正確に 20～50 mL とした。この溶液を液体クロマトグラフ法により分析し、あらかじめ作成した検量線から TG44 濃度を求めた。

性状： 固体の性状はミノルタ（株）製色彩色差計 CR-200 型を使用し測定した。ヘッドは CR-200 型を使用し、色相・明度・彩度を測定した。

光学顕微鏡： オリンパス（株）製光学顕微鏡 BH-2 を用いて観察した。

かさ密度： ゆるみかさ密度は、試料 5 g をロートを用いてメスシリンダーの器壁に沿って落とした後、その体積を計測した。タップかさ密度は小西製作所（株）製 KC-RHK 型タッピング器を用いて測定した。タップかさ密度は、ゆるみかさ密度測定後のメスシリンダーを用い、落下距離 1 cm、120 rpm、2 分間振とう後の体積を計測した。

粒度分布： ふるい分け法による粒度分布は、筒井理化学器械（株）製マイクロ形電磁振動ふるい器 M-2 型を用い、日局一般試験法の粉体粒度測定法に準じて行った。レーザー光散乱法による粒度分布は、シスメックス（株）製 レーザー回折式粒度分布測定装置マスターサイザー 2000 を用い、乾式法で行った。

pH： pH は、東亜電波工業（株）製 pH メーター HM-60S 型を使用し、TG44/ β -CyD 複合体 1.5% 水溶液の 25℃ における pH を日局一般試験法 pH 測定法に準じて測定した。なお、TG44 は難水溶性であるため、本濃度条件下での pH 測定は困難であった。

融点： 融点測定は、Flawil 製 BÜCHI 535 型を使用し、日局一般試験法の融点測定法（第 1 法）に準じて行った。

比旋光度： 比旋光度の測定は、日本分光（株）製 DIP-370 型旋光計を使用し、日局一般試験法の旋光度測定法に準じて 20℃ で TG44/ β -CyD 複合体水溶液（0.1%）を測定した。 $[\alpha]_D^{20}$ 約 +107.1～+110.1°（0.1% 水溶液）。

溶出試験： 粉末法を用いて測定した。25℃ の循環水を通じたジャケットビーカー（内径 3 cm、内容積 200 mL）に精製水 100 mL を入れ、50～200 rpm でパドルを回転させ、錠剤試料 1.5 g を加えた。経時的に溶液 約 2 mL を採取し、メンブランフィルター（セルロースアセテート、0.20 μm ）でろ過した。このろ液 1 mL

を正確に採取し、水／アセトニトリル混液（1:1）を加えて正確に 100 mL とし、UV 検出器を用いて定量した。

5. *In vitro* 抗菌活性試験

寒天平板希釈法による発育阻止濃度（Minimum Inhibitory Concentration, MIC）の測定は日本化学療法学会標準法に準じて実施した。下記にその実験例を示す。H. ピロリ以外の菌株の測定についても日本化学療法学会標準法に準じて実施した。

感受性測定用培地： ブレインハートインフュージョン寒天培地に β -CyD を 0.1% 添加して使用した。

溶解および希釈法： 下記のように、16 $\mu\text{g/mL}$ の 2 倍希釈系列を用いた（16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625, 0.0313 $\mu\text{g/mL}$ ）。まず、1.6 mg/mL のメタノール溶液を調製し、滅菌蒸留水で 410 倍希釈し 160 $\mu\text{g/mL}$ とした。以後、滅菌蒸留水で 2 倍希釈系列を作製した。これらの溶液をシャーレに 1 mL 分注し、滅菌後 50°C に保温した感受性測定用寒天培地 9 mL を加え、よく混和し感受性測定用平板とした。

接種用菌液： 増菌用培地には、0.1% β -CyD を添加したブレインハートインフュージョン（Difco）を使用し、微好気条件下（アネロバック・キャンピロを使用）、37°C で 24 時間振盪培養を行った。培養後、増菌用培地を用いて約 10^7 CFU/mL に調整したものを接種菌液とした。

菌の接種法： ニクローム線ループ（内径 1 mm）で約 2 cm 画線塗抹した。

培養温度、時間： 微好気条件下（アネロバック・キャンピロを使用）35°C、3 日間培養した。

判定： 発育が完全に阻止された最低濃度を MIC 値とした。

6. スナネズミを用いた H. ピロリ感染実験

使用動物： MON/Jms/Gbs Slc ♂（スナネズミ）を 5 週齢で購入し、1 週間程度の予備飼育後使用した。

使用菌株： *Helicobacter pylori* ATCC 43504（-85°C で凍結保存）。

培養条件： 37 °C で 24 時間微好気環境下で振盪培養した。 10% ウシ胎児血清添加ブレインハートインフュージョン 5 mL に凍結菌液を 100 μ L 接種した。

接種菌量： 新鮮菌液 (約 3×10^8 CFU/mL) を 0.5 mL/animal 経口投与した。

接種方法： 24 時間絶食後 (金網製の個別ケージ使用) 1 回接種した。 なお、接種後 4 時間は絶水絶食とした。

治療： 菌接種 14 日目に行った。

胃摘出法： 頸椎脱臼後、胃を摘出しシャーレ内で切開し、内容物をピンセットで除いた (洗浄は行わない)。 0.1 M リン酸塩緩衝液 (pH 7.2) 20 mL を入れた 50 mL 容量の遠沈管に胃組織を加えてホモジナイズし、生菌数測定の試料とした。

生菌数測定： 試料は PBS を用いて希釈 (0, -1, -2, -3) した。 各 0.1 mL を *H. pylori* 選択培地に塗抹し、37°C で 5 ~ 7 日間微好気環境下で培養した。 シャーレは各 2 枚用いた。 *H. pylori* 選択培地の条件は以下の通りである。 ブルセラ培地 43 g、馬脱繊維血液 100 mL、バンコマイシン 10 mg、ポリミキシン B 2500U、トリメトプリム 5 mg、アンホテリシン 2 mg、塩化 2,3,5-トリフェニルテトラゾリウム 50 mg、蒸留水 900 mL、pH 7.2 \pm 0.2。

参 考 文 献

- 1) B. J. Marshall and J. R. Warren; Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet*, 323, 1311-1315 (1984).
- 2) International Agency for Research on Cancer, World Health Organization, Lyon, France, "Monographs on the evaluation of Carcinogenic risks to humans." 1994. 61. pp. 177-240.
- 3) P. K. Bardhan; Epidemiological features of *Helicobacter pylori* infection in developing countries, *Clin. Infect. Dis.*, 25, 973-978 (1997).
- 4) The EUROGAST Study Group; An international association between *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer. *Lancet*, 341, 1359-1362 (1993).
- 5) D. N. Taylor and M. J. Blaser; Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection, *Epidemiol. Rev.*, 13, 42-59 (1991).
- 6) H. M. Alaty, D. Y. Graham and A. W. Wendy; Natural history of *Helicobacter pylori* infection in childhood : 12-year follow-up cohort study in a biracial community, *Clin. Infect. Dis.*, 28, 279-282 (1999).
- 7) T. K-F. Chow, J. R. Lambert and M. L. Wahlgvist; Evidence for oral-oral transmission via chopsticks. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 10, 562-569 (1995).
- 8) M. Deltenre, I. de Bruyne, C. Jonas and E. de Koster; Pharmacoeconomics in HP-related diseases: more questions than answers, *Acta Gastro-Enterologica Belgica*, LXI, 352-356 (1998).
- 9) Y. Glupczynski; Antimicrobial resistance in *Helicobacter pylori*: a global overview, *Acta Gastro-Enterologica Belgica*, LXI, 357-366 (1998).
- 10) F. Mégraud and H. P. Doermann; Clinical relevance of resistant strains of *Helicobacter pylori*: a review of current data. *Gut*, 43, (suppl. I), S61-65 (1998).
- 11) R. P. Walt; Metronidazole-resistant *H. pylori* of questionable clinical importance, *Lancet*, 348, 489-490 (1996).
- 12) D. Y. Graham, W. A. de Boer and G. N. Tytgat; Choosing the best anti-*Helicobacter pylori* therapy: effect of antimicrobial resistance. *Am. J. Gastroenterol.*, 91, 1072-1076 (1996).
- 13) A. H. Soll; Consensus conference. Medical treatment of peptic ulcer disease. Practice guidelines. Practice Parameters, Committee of the American College of Gastroenterology. *JAMA*, 275, 622-629 (1996).

- 14) T. Alarcón, D. Domingo and M. López-Brea; Antibiotic resistance problems with *Helicobacter pylori*. *Intnl. J. Antimicrobial Agents*, **12**, 19-26 (1999).
- 15) AMBI, Apply; 1996/12/20, No. US5804549.
- 16) クラレ, Apply; 1997/4/23, No. WO9739764.
- 17) D. French, A. O. Pulley, J. A. Effenberger, M. A. Rougvie and M. Abdullah; Studies on the Schardinger dextrans : XII. The molecular size and structure of the δ -, ϵ -, ζ - and η -dextrans, *Arch. Biochem. Biophys.*, **111**, 153-160 (1965).
- 18) A. R. Hedges; Industrial applications of cyclodextrins, *Chem. Rev.*, **98**, 2035-2044 (1998).
- 19) W. Saenger; Cyclodextrin inclusion compounds in research and industry, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **19**, 344-362 (1980).
- 20) D. Duchêne.; "New trends in cyclodextrins and derivatives." Editions de Santé. Paris, 1991.
- 21) M. Noltemeyer and W. Saenger; X-Ray studies of linear polyiodide chains in α -cyclodextrin channels and a model for the starch-iodine complex, *Nature*, **259**, 629-632 (1976).
- 22) K. Takeo and T. Kuge; Complexes of starch materials with organic compounds. Part III. X-Ray studies on amylase and cyclodextrin complexes. *Agr. Biol. Chem.*, **33**, 1174-1180 (1969).
- 23) K. Uekama, F. Hirayama and T. Irie; Cyclodextrin drug carrier systems. *Chem. Rev.*, **98**, 2045-2076 (1998).
- 24) K. Uekama; Design and evaluation of cyclodextrin-based drug formulation. *Chem. Pharm. Bull.*, **52**, 900-915 (2004).
- 25) T. Loftsson, P. Jarbo, M. Másson and T. Järvinen; Cyclodextrins in drug delivery, *Expert Opin. Drug Deliv.*, **2**, 335-351 (2005).
- 26) T. Loftsson and M. E. Brewster; Pharmaceutical applications of cyclodextrins, *J. Pharm. Sci.*, **85**, 1017-1025 (1996).
- 27) V. J. Stella and R. A. Rajewski; Cyclodextrins: Their future in drug formulation and delivery. *Pharm. Res.*, **14**, 556-567 (1997).

- 28) K. Uekama and F. Hirayama; "Improvement of drug properties by cyclodextrins." *The Practice of Medicinal Chemistry*, Chap. 38, 2nd Ed. by C. G. Wermuth, Academic Press, London, UK, 2003, pp. 649-673.
- 29) K. Uekama and M. Otagiri; Cyclodextrin in drug carrier systems, *CRC Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Systems*, 3, 1-40 (1987).
- 30) 池田陽一, 松元孝次, 国弘和, 不破 亨, 上釜兼人; 精油成分と α - および β -シクロデキストリンとの包接複合体形成, *薬誌*, 102, 83-88 (1982).
- 31) 上釜兼人; 多機能性薬物担体としてのシクロデキストリンの製剤への応用, *薬誌*, 124, 909-935 (2004).
- 32) 上釜兼人; シクロデキストリン Complex の製剤への応用, *薬誌*, 101, 857-873 (1981).
- 33) 池田 憲, 上釜兼人; 製剤における相互作用と安定性, *薬局*, 23, 1039-1044 (1972).
- 34) K. A. Connors; The stability of cyclodextrin complexes in solution, *Chem. Rev.*, 97, 1325-1357 (1997).
- 35) W. Saka, Y. Yamamoto, Y. Inoue, R. Chujo, K. Takahashi, and K. Hattori; ^1H NMR study of conformation of formyl-L-phenylalanyl-6-deoxy-6-amino-cyclomaltoheptaose that has excellent ability of chiral recognition, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 63, 3175-3182 (1990).
- 36) T. Higuchi and K. A. Connors; Phase-solubility techniques, *Adv. Anal. Chem. Instr.*, 4, 117-212 (1965).
- 37) P. Job; Formation and stability of inorganic complexes in solution, *Ann. Chem.*, 9, 113-203 (1928).
- 38) R. L. Scott; Some comments on the Benesi-Hildebrand equation, *Rec. Trav. Chim.*, 75, 787-789 (1956).
- 39) H. J. Schneider, F. Hacket, V. Rüdiger and H. Ikeda; NMR studies of cyclodextrins and cyclodextrin complexes, *Chem. Rev.*, 98, 1755-1785 (1998).
- 40) M. M. Meier, M. T. B. Luiz, P. J. Farmer and B. Szpoganicz; The influence of β - and γ -cyclodextrin cavity size on the association constant with

decanoate and octanoate anions, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.*, **40**, 291-295 (2001).

- 41) 仲井由宜; 製剤中の医薬品の分子状態について, *薬誌*, **105**, 801-811 (1985).
- 42) F. Giordano, G. Bruni and G.P. Bettinetti; Solid state microcalorimetry on drug-cyclodextrin binary systems, *J. Thermal Anal.*, **38**, 2683-2691 (1992).
- 43) K. Kimura, F. Hirayama, H. Arima and K. Uekama; Solid-state ^{13}C nuclear magnetic resonance spectroscopic study on amorphous solid complexes of tolbutamide with 2-hydroxypropyl- α - and β -cyclodextrins, *Pharm. Res.*, **16**, 1729-1734 (1999).
- 44) K. Murata, S. Kuroki, H. Kimura and I. Ando; A study of conformational stability of poly(L-alanine), poly(L-valine), and poly(L-alanine)/poly(L-valine) blends in the solid state by ^{13}C cross-polarization/magic angle spinning NMR. *Biopolymers*, **64**, 26-33 (2002).
- 45) K. Murata, S. Kuroki and I. Ando; A study of the conformational stability of poly(L-alanine), poly(D-alanine), poly(L-isoleucine), polyglycine and poly(L-valine) and their polypeptide blends in the solid-state by ^{13}C CP/MAS NMR. *Polymer*, **43**, 6871-6878 (2002).
- 46) D. Duchêne; "Cyclodextrins and their industrial uses," Editions de Santé, Paris, 1987.
- 47) J. Sztatish, S. Gal, J. Komives, A. Stadler-Szoke and J. Szejtli; Thermoanalytical Investigations on Cyclodextrin Inclusion Compounds Thermal Analysis, Proc 6th Int. Conf., Bayreuth 1980, ed.: H.G. Wiedemann, Birkhauser Verlag, Basel, 1980, 487, (C. A. 94: 140068).
- 48) J. Sztatish, S. Gal, J. Komives, A. Stadler-Szoke and J. Szejtli; Proc. 1st Sym. Cyclodextrins (Ed.: J. Szejtli), Reidel, Dordrecht, (1982), 237, (C. A. 98: 160030).
- 49) 網川延孝, 村山 晋, 田村文造, 矢谷幸三, 永井保嵩, 松倉 迅, 上野政一; 吸湿試験法に関する研究 (第 2 報), *医薬品研究*, **22**, 173-176 (1991).
- 50) H. Nogami, T. Nagai and Y. Yotsuyanagi; Dissolution phenomena of organic medicinals involving simultaneous phase changes, *Chem. Pharm. Bull.*, **17**, 499-509 (1969).
- 51) Japan Society of Chemotherapy; "Method of MIC determination," Chemotherapy, 1981, 29, pp. 76-79.

- 52) R. Olivivieri, H. Bugnoli, D. Armellini, S. Bianciardi, R. Rappuoli, P. F. Bayeli, L. Abate, E. Esposito, L. de Gregorio and J. Aziz: Growth of *Helicobacter pylori* in media containing cyclodextrins, *J. Clin. Microbiol.*, 31, 160-162 (1993).
- 53) F. Hirayama, S. Takagi, Y. Yokoyama, E. Iwao and Y. Ikeda: Establishment of gastric *Helicobacter pylori* infection in Mongolian gerbils, *J. Gastroenterol.*, 31, Suppl 9:24-28 (1996).
- 54) ナガセケムテックス, Apply; 1996/3/7, No. WO96/06825.